



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
**2006**

**Maria Nélia Soares  
Leonardo**

**Variação morfológica de *Melarhappe neritoides* ao  
longo de um gradiente latitudinal na Península Ibérica**



**Maria Nélia Soares  
Leonardo**

**Variação morfológica de *Melarhappe neritoides* ao longo de um gradiente latitudinal na Península Ibérica**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências das Zonas Costeiras, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor Henrique José de Barros Brito Queiroga, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutora Maria Ana Dias Monteiro Santos**  
Professora Catedrática da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor José Pavão Mendes de Paula**  
Professor Associado com Agregação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

**Prof. Doutor Henrique José de Barros Brito Queiroga**  
Professor Auxiliar com Agregação da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Ao Professor Doutor Henrique Queiroga, orientador desta dissertação, agradeço o incondicional apoio prestado durante o delineamento e orientação deste trabalho e a permanente disponibilidade que sempre demonstrou na resolução dos problemas surgidos. Agradeço ainda as suas sugestões e críticas durante a elaboração desta dissertação.

Ao Rolando Costa quero agradecer a ajuda prestada no trabalho de campo e de laboratório.

Aos meus colegas de laboratório, Sérgio Leandro, Carla Domingues e Susana Oliveira, quero agradecer pela colaboração que prestaram sempre que necessário.

Em termos institucionais, quero expressar o meu agradecimento à Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, pela disponibilização dos meios técnicos e logísticos necessários à realização deste trabalho.

Por fim agradeço à minha família todo o apoio que me deram sem o qual a realização desta tese teria sido impossível.

## resumo

Algumas espécies de gastrópodes da família Littorinidae possuem um ciclo de vida que inclui uma fase larvar planctónica. As larvas são consideravelmente móveis na coluna de água e por isso os indivíduos que sobrevivem após um período de tempo depois do assentamento partilham um fundo genético comum. Em consequência disto, a adaptação local é limitada e a existência de algumas variações é explicada pela plasticidade fenotípica.

A diferenciação morfológica da concha de *Melarhappe neritoides* (Gastropoda, Littorinidae), com desenvolvimento larvar, foi analisada em vinte praias rochosas ao longo da costa de Portugal e da Galiza. A colheita foi efectuada no período de Novembro de 2003 a Setembro de 2004.

Foram aplicados métodos de morfometria geométrica a amostras aleatórias de 30 organismos de cada local para permitir identificar variações na forma da concha ao longo do gradiente geográfico independentemente do tamanho dos organismos.

Os resultados mostram existir diferenças significativas na forma da concha desta espécie ao longo de um gradiente de Norte para Sul, desde a costa da Galiza até à costa Centro de Portugal. A concha de *Melarhappe neritoides* das regiões da Galiza e do Norte de Portugal é mais achatada no ápice e mais alargada, comparativamente com a concha das populações do Centro da costa portuguesa. Estas variações latitudinais na forma da concha podem ser atribuídas a pressões selectivas do ambiente. A variação da forma da concha observada nos espécimes das regiões Sul e Algarve-Sul não poderá ser atribuída exclusivamente a pressões selectivas do ambiente.

## abstract

Some gastropod species of the Littorinidae family include a larval stage during their life cycle. Larvae show considerable mobility in the water column and consequently individuals are thus recruited from a common gene pool. This prevents local adaptation, and the existence of minor adjustments is possible through a plastic phenotype.

Shell morphological differentiation of *Melarhappe neritoides* (Gastropoda, Littorinidae), a species with larval dispersal, was analysed by collecting molluscs at twenty rocky shores along the intertidal Portuguese and Galician coasts. Samples were taken from November 2003 to September 2004.

Geometric-morphometric methods for landmark data allow us to disentangle size from shape components of the snail shell. These methods were applied using uphazardly taken samples of 30 individuals from each place, in order to identify shell shape variation along the latitudinal gradient.

The results show significant differences in shell shape along a North-South gradient. Shells of *Melarhappe neritoides* from the northern regions of Portugal and Galicia are characteristically more rounded in the apex and more globose than Central population shells of the Portuguese coast. This shell shape variation appears to be driven by particular habitat characteristics responsible of different selection pressure at a geographical scale. The effect of different selection pressure on shell shape variation of South and Algarve-South populations could not be established.

# ÍNDICE

## Agradecimentos

## Resumo

## Abstract

<b>1. Introdução e objectivos .....</b>	<b>0</b>
1. 1. Introdução geral.....	1
1.2. Os Litorinídeos como modelo biológico.....	2
1.3. Características da concha dos litorinídeos.....	3
1.4. Distribuição geográfica dos Litorinídeos.....	6
1.5. Análise da forma.....	8
1. 6. Objectivos .....	10
<b>2. Aspectos da biologia de <i>Melarhaphe neritoides</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>3. Breve descrição hidrológica e geomorfológica da costa Portuguesa e da Galiza .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Morfometria geométrica – aspectos teóricos.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Materiais e métodos.....</b>	<b>23</b>
5. 1. Localização das estações de amostragem .....	23
5. 2. Métodos de amostragem biológica.....	24
5. 3. Aquisição de dados sobre a forma da concha .....	24
5. 4. Digitalização dos marcos anatómicos .....	26
5. 5. Análise e tratamento de dados.....	27
<b>6. Resultados .....</b>	<b>28</b>
<b>7. Discussão e conclusões.....</b>	<b>4444</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>47</b>

## 1. Introdução e objectivos

### 1. 1. Introdução geral

Os organismos marinhos de praias rochosas estão sujeitos a *stress* físico devido a factores abióticos como a temperatura, salinidade e acção das ondas, e a factores bióticos como a competição e a predação, entre outros (Raffaelli e Hawkins, 1996; Johannesson, 2003). Estes factores variam numa escala temporal e espacial, produzindo habitats heterogéneos com acentuados gradientes de selecção que têm uma forte influência na evolução das populações destes organismos marinhos.

Como resposta à heterogeneidade do ambiente, as espécies de gastrópodes da família Littorinidae adoptam estratégias alternativas. A estratégia generalista combina um fenótipo adaptado à maioria dos habitats, com um modo de dispersão eficaz por larvas planctotróficas. As larvas podem recolonizar rapidamente habitats após alterações ambientais extremas que eliminem as populações de indivíduos adultos residentes. No entanto, as espécies de Littorinídeos com estratégia generalista apresentam reduzida capacidade de adaptação a variações das condições locais. Por outro lado, noutras espécies da mesma família, a ausência de larvas não permite uma rápida colonização dos habitats, mas promove a adaptação local por subpopulações que se mantêm geração após geração no mesmo habitat (Johannesson, 2003).

As praias rochosas da costa portuguesa são excelentes locais para o estudo de processos biogeográficos, na medida em que existe um gradiente para muitas espécies de águas sub-tropicais e Mediterrânicas e para espécies de água fria. Algumas espécies mostram uma diminuição na abundância (por exemplo, de Norte para Sul, *Mytilus galloprovincialis* e *Nucella lapillus* e de Sul para Norte, *Siphonaria pectinata*) ou atingem o seu limite geográfico ao longo da costa (por exemplo, *Ascophyllum nodosum* e *Himanthalia elongata*, cujo limite da sua distribuição é o norte de Portugal)(Boaventura *et al.*, 2002). Estudos efectuados por estes autores relativamente à estrutura das comunidades eulitorais ao longo das diferentes regiões da costa portuguesa mostram que a região norte difere



consideravelmente das regiões centro e sul. A região norte diferencia-se da região sul por uma maior abundância de *Mytilus galloprovincialis*, *Patella vulgata*, e *Littorina saxatilis*. Contrariamente, nas regiões Centro e Sul existe uma maior abundância de *Corallina spp.*, *Patella ulyssiponensis*, e *Siphonaria pectinata*.

*Melarhappe neritoides* é uma espécie de gastrópode da família Littorinidae com dispersão larvar e um dos organismos mais abundantes na zona supralitoral das praias rochosas ao longo da costa de Portugal (Boaventura *et al.*, 2002) e Galiza. Com este trabalho pretendeu-se analisar a variação morfológica da concha de *Melarhappe neritoides* ao longo da costa de Portugal e da Galiza, recorrendo a métodos que caracterizam a variação da forma da concha de um modo quantitativo. Um aspecto ainda mal conhecido para esta espécie é o da relação entre a dispersão larvar e a variação morfológica da concha ao longo de um gradiente geográfico, pelo que, adicionalmente se procurou inferir sobre a relação entre o modo de dispersão desta espécie e a variação morfológica.

## 1.2. Os Litorinídeos como modelo biológico

Os Litorinídeos são os gastrópodes marinhos mais amplamente estudados. Estes gastrópodes têm sido considerados organismos apropriados para o estudo de comportamento animal, em particular os movimentos em relação à zonação, os ritmos de actividade, e respostas alimentares. Têm também sido muito utilizados em estudos fisiológicos e bioquímicos, como por exemplo, a tolerância à temperatura, a osmoregulação, respiração, nutrição e excreção (Reid, 1996). A investigação anatómica das espécies do género *Littorina* relacionava-se inicialmente com o sistema reprodutor, o tipo de larvas e a embriologia, e em 1962 Fretter e Graham descreveram *L. littorea* em detalhe, como um exemplo padrão da anatomia dos gastrópodes prosobrânquios. Estudos posteriores de anatomia começaram a ter impacto na taxonomia deste grupo, com a identificação de novas espécies. Os avanços no campo da genética molecular, ecologia das comunidades, e do estudo da variação e selecção natural, confirmaram a descoberta destas novas espécies. Os Litorinídeos apresentam uma grande variedade de tipos de desenvolvimento, incluindo desenvolvimento

larvar pelágico e encapsulado e ovoviviparidade, o que permite testar teorias de estratégias reprodutivas.

O desenvolvimento de técnicas de electroforese para investigação da variação enzimática, aumentou muito a compreensão acerca da diferenciação interespecífica e da variação intraespecífica entre as espécies de *Littorina*. Estudos de alozimas têm em muitos casos apoiado a existência de novas espécies que tinham sido inicialmente identificadas com base em características anatómicas. Contudo, noutros casos, variedades distintas de conchas são tão semelhantes geneticamente, que são consideradas como ecotipos de espécies com grande variabilidade. Uma importante diferença tem sido revelada na estrutura genética de espécies de *Littorina*, de acordo com os seus ciclos de vida: aquelas que têm larvas pelágicas velígeras, são geneticamente uniformes ao longo de grandes distâncias geográficas, como resultado de um elevado fluxo genético causado pela dispersão larvar; em contraste, aquelas que não possuem dispersão larvar mostram frequentemente diferenciação entre populações locais, mesmo numa escala de poucos metros (Johannesson, K., 1992).

Dado que as espécies de *Littorina* são abundantes na zona intertidal, e estão amplamente distribuídas, têm sido usadas para monitorizar a poluição causada por metais pesados, compostos orgânicos e substâncias radioactivas, e em estudos laboratoriais para testar os efeitos fisiológicos e celulares destes poluentes (Reid, 1996).

### 1.3. Características da concha dos litorínídeos

As características morfológicas usadas para a discriminação taxonómica e análise filogenética de gastrópodes da família Littorinidae encontram-se divididas, de uma forma artificial, na anatomia das partes moles do corpo e nas características da concha. A compreensão da variação da forma da concha pressupõe a identificação dos factores intrínsecos e extrínsecos que contribuem para esta variação. Estes, no entanto, continuam a ser pouco compreendidos (Reid, 1996). Reconhece-se existirem algumas associações previsíveis entre a forma da concha de uma população e o respectivo habitat. As variações da forma

da concha observadas em diferentes habitats têm sido explicadas como adaptações resultantes de selecção natural por agentes como por exemplo predadores e a acção das ondas. Esta explicação pressupõe que as diferenças observáveis sejam, pelo menos em parte, geneticamente determinadas, apesar de isto ter sido demonstrado em poucos casos (Reid, 1996). Numa das espécies de litorinídeos melhor estudadas, *Littorina saxatilis*, demonstrou-se a existência de uma componente genética na determinação da forma da concha. As diferenças na taxa de crescimento da concha, são também em parte determinadas geneticamente (Johannesson, B. e Johannesson, K., 1996, *cit. in* Reid, 1996). Estes autores verificaram que juvenis criados em laboratório mantinham as mesmas características que a população de progenitores, como confirmado por análise morfométrica.

As variações fenotípicas podem não estar associadas apenas a uma diferenciação genética, na medida em que a forma da concha manifesta plasticidade fenotípica sob a influência de factores ambientais. Esta variação ecofenotípica encontra-se estudada em muricídeos intertidais e em gastrópodes pulmonados de água doce. Um dos factores mais importantes que influenciam a forma da concha, parece ser a taxa de crescimento, a qual por sua vez é afectada por factores ambientais como a quantidade e qualidade de alimento, o tempo de alimentação, e a densidade de indivíduos da mesma espécie, ou de espécies competidoras. Em *Littorina littorea*, uma espécie de gastrópode com larvas planctotróficas da zona intertidal, a baixas densidades populacionais os organismos crescem mais rapidamente e produzem conchas mais finas, com aberturas mais arredondadas, maior volume interno, formas mais globulares e pouco espiraladas (Kemp e Bertness, 1984, *cit. in* Reid, 1996).

Para além dos factores ambientais atrás referidos, a turbulência e a acção das ondas podem ser outra fonte de efeitos ecofenotípicos, como no caso do alargamento da abertura da concha em *Nucella*, em resposta à acção das ondas (Etter, 1988a, *cit. in* Reid, 1996).

A alometria, mudança da forma com o aumento do tamanho, apresenta uma relação complexa com a taxa de crescimento e com o tamanho adulto, e poderá explicar em parte a plasticidade fenotípica da forma da concha. Em

espécies do género *Littorina*, e durante o desenvolvimento da concha, o ângulo do ápice primeiro aumenta, seguidamente permanece constante, e vai diminuindo à medida que a concha se aproxima do tamanho máximo (Vermeij, 1980, *cit. in* Reid, 1996). Quando existem diferenças de tamanho entre populações de microhabitats contrastantes, a alometria poderá contribuir directamente para as diferenças observadas na forma, e deverá ser tomada em conta nas análises morfométricas (Sundberg, 1988, *cit. in* Reid, 1996). No que diz respeito a *Melarhappe neritoides*, Bosch e Moreno (1986) referem que a altura da concha é alométrica relativamente à abertura, ou seja, a abertura é proporcionalmente mais pequena em espécimes maiores, o que conduz a uma maior resistência à dessecação e temperaturas elevadas, mas também a uma diminuição da capacidade de aderência ao substrato e portanto menor resistência à acção das ondas.

Potencialmente, quer os efeitos ecofenotípicos quer os efeitos alométricos poderão contribuir para a variação intraespecífica observada em todas as espécies de *Littorina*, independentemente de factores tais como o tamanho da população, o tipo de desenvolvimento, e a sua dispersão. No entanto, estes últimos factores irão influenciar o efeito da selecção natural na diferenciação genética.

As espécies com desenvolvimento planctotrófico evidenciam menor variação intraespecífica, no espaço e no tempo, comparativamente com as espécies que não têm dispersão larvar. As espécies planctotróficas são grandemente dispersas pelos ovos pelágicos e pelas larvas velígeras que permitem níveis elevados de fluxo genético em grandes populações, nas quais pequenas diferenças selectivas são atenuadas pelo recrutamento de indivíduos de uma grande área. Johannesson (1992), em estudos realizados para determinar a variação alozimática, encontrou baixos níveis de diferenciação para *Melarhappe neritoides* (com larvas planctotróficas) ao longo de milhares de quilómetros, desde a Suécia à Grécia. Em contraste, as espécies não planctotróficas estão separadas em populações relativamente isoladas umas das outras por reduzido fluxo genético, permitindo diferenciação genética através de diferenças selectivas microambientais, ou de deriva genética.

#### 1.4. Distribuição geográfica dos Litorinídeos

A distribuição dos invertebrados marinhos é frequentemente limitada pelos efeitos directos ou indirectos da temperatura (Kinne, 1970, *cit. in* Reid, 1996). Reid (1996) refere que, para espécies do género *Littorina*, se verifica o efeito deste factor pelas correlações entre a distribuição e a temperatura da água do mar na zona limite de distribuição. No entanto, o mecanismo pelo qual a temperatura controla a distribuição dos organismos está ainda pouco compreendido. Não parece existir efeito directo da temperatura nos indivíduos adultos, na medida em que estes indivíduos resistem bem às temperaturas elevadas e baixas (Reid, 1996). O efeito limitante da temperatura pode, por outro lado, ter influência noutros estádios do ciclo de vida destes organismos. Nos limites mais a norte da gama de distribuição de *Littorina littorea* (planctotrófica) há um encurtamento do período de reprodução, que se limita aos meses de Verão, sugerindo que será necessária uma temperatura mais elevada para a desova.

Os efeitos indirectos da temperatura podem estar relacionados com a disponibilidade de algas para alimento, e a existência de predadores ou de competidores.

A salinidade é outro aspecto do habitat físico que pode influenciar a distribuição geográfica das várias espécies de Litorinídeos. Valores baixos salinidade limitam a distribuição nas regiões de grandes estuários, onde a distância de penetração é determinada pela tolerância fisiológica à baixa salinidade (Reid, 1996).

Nas linhas costeiras a falta de um substrato rochoso adequado pode condicionar a distribuição geográfica das espécies a uma escala local e geográfica (Reid, 1996). Por exemplo, não existem Litorinídeos na costa francesa a sul de Gironde, onde as praias são inteiramente de areia (Crisp e Fischer-Piette, 1959, *cit. in* Reid, 1996). A composição da rocha também pode ser importante. A distribuição de *L. compressa* e de *L. arcana* é limitada em algumas partes da Bretanha e do Canal da Mancha por requererem uma rocha cristalina e dura para a ligação das suas massas de ovos gelatinosos ao substrato (Mill e Grahame, 1990; Warmoes *et al.*, 1992, *cit. in* Reid, 1996).

Outro aspecto da distribuição geográfica e que está relacionado com o habitat, é o da distinção entre padrões de distribuição "oceânica" e "continental". Espécies com distribuição oceânica ocorrem em grandes ilhas e às vezes em grandes penínsulas, enquanto que as espécies de distribuição continental estão principalmente restritas às costas continentais, incluindo habitats estuarinos. Esta distribuição pode ser observada em vários géneros de Litorinídeos. A distinção entre espécies oceânicas e continentais pode ser em parte uma simples manifestação à escala geográfica de necessidades de habitat, e de tolerância fisiológica. As espécies tolerantes à acção forte das ondas e incapazes de sobreviver nos ambientes estuarinos de águas turvas, irão fazer parte das regiões oceânicas.

Outros factores oceanográficos poderão estar envolvidos, como uma elevada concentração de nutrientes, elevada produtividade primária, turbidez das águas nas margens continentais, e também padrões de circulação oceânica que influenciem particularmente ovos pelágicos e larvas planctotróficas (Reid, 1996).

No que diz respeito à variação geográfica da forma da concha de gastrópodes marinhos da família Littorinidae, Reid (1996) considera existir uma tendência para se encontrar indivíduos de maiores dimensões no limite norte da sua área de distribuição. Esta tendência latitudinal poderá estar relacionada com um ritmo de divisão celular mais reduzido e um aumento correspondente do tamanho das células a baixas temperaturas. Outra explicação, é a da que, pelo facto de existir uma maior produtividade de algas nos mares ricos em nutrientes situados a norte, associada a um encurtamento do período de reprodução, o maior tamanho da concha seja um reflexo de condições mais favoráveis para o crescimento somático (Vermeij, 1978, *cit. in* Reid, 1996).

A energética do processo de calcificação a baixas temperaturas, pode também influenciar a forma da concha à escala geográfica. Gastrópodes de latitudes mais elevadas apresentam uma concha tipicamente fina e com uma forma globular. Esta forma de concha é o reflexo do uso mais eficaz do material da concha para englobar o corpo do animal, o que é explicado pelo maior custo energético da calcificação em águas frias, nas quais o carbonato de cálcio é mais solúvel (Graus, 1974; Clark, 1983, *cit. in* Reid, 1996). Vermeij (1973, *cit. in* Reid,

1996) descreveu gradientes latitudinais na forma da concha de diferentes espécies de litorínídeos, em habitats do supra-litoral. Existe um aumento da altura do tamanho das voltas da concha e correspondente redução da abertura, de norte para sul. Esta tendência é interpretada como adaptativa, reduzindo-se a área de contacto entre o pé do gastrópode e o substrato rochoso quente, e maximizando-se a área da superfície da concha para radiação de calor, relativamente à absorção de radiação solar directa.

A variação geográfica da forma da concha depende ainda de outros factores, como por exemplo a pressão selectiva efectuada por predadores. A concha de *Littorina obtusata* das regiões sub-árticas é mais alongada e a sua espessura é mais reduzida em relação à forma da concha de populações que se encontram mais a sul. Esta variação morfológica, que contraria o que foi anteriormente referido, é interpretada como uma resposta das populações do sul a uma predação intensa por caranguejos *Carcinus maenas* (Seeley, 1986 *cit. in* Reid, 1996).

### 1.5. Análise da forma

A morfometria inclui métodos para a descrição e análise estatística da variação da forma dentro e entre amostras de organismos, e também para a análise da variação da forma como resultado do crescimento, tratamento experimental, ou evolução. Os métodos morfométricos são necessários, sempre que é preciso descrever e comparar formas de organismos ou de estruturas específicas (Rohlf e Marcus, 1993).

A morfologia da concha tem sido muito estudada utilizando distâncias lineares, proporções e análise multivariada. Estes métodos confundem o tamanho com a forma e por isso os resultados estão dependentes do tipo de distâncias e do tipo de proporções escolhidas (Bookstein, 1991).

A morfometria geométrica é uma metodologia mais eficaz para extrair informação acerca da forma do organismo, em particular quando combinada com técnicas estatísticas multivariadas (Rohlf., 1990; Rohlf e Marcus, 1993). Os seguintes pontos caracterizam esta abordagem (Rohlf e Marcus, 1993):

1 – os dados são registados de maneira a capturar a geometria da estrutura analisada. Este registo pode ser feito na forma de coordenadas (a duas ou a três dimensões) dos marcos anatómicos (*landmarks*). Os marcos anatómicos estabelecem uma representação simplificada de cada organismo: cada configuração de marcos anatómicos corresponde a um determinado indivíduo. Os marcos anatómicos devem ser homólogos entre os espécimes em estudo; assim, em lugar de referir apenas que a forma mudou, podemos mencionar que certas estruturas se movimentaram umas em relação às outras.

2 – as relações geométricas entre os marcos anatómicos não são inerentes às coordenadas em si de cada um deles; assim, a relação entre estes pontos é extraída através de uma função que a eles se adapta a 2-D ou a 3-D. Os valores estimados dos parâmetros da referida função podem ser posteriormente usados em análise estatística univariada ou multivariada. Bookstein (1991) propôs ainda o uso de funções que se adaptam às diferenças de configuração de marcos anatómicos de um organismo relativamente a outro.

3 – as análises atrás referidas indicam as direcções em que ocorre a maior variação na forma, e assim podem sugerir quais as variáveis convencionais a que se deverá atribuir maior importância aquando da descrição dos resultados.

4 – é dada ênfase à apresentação visual dos resultados das análises, utilizando diferenças ou mudanças que podem ser mostradas em representações gráficas dos organismos estudados. Estas representações são expressas em termos de distâncias num espaço de duas ou três dimensões do organismo.

A abordagem da morfometria geométrica é actualmente utilizada em numerosos estudos biológicos. Carvajal-Rodríguez, *et al.* (2004), referem, no entanto, não existirem estudos que utilizam a morfometria geométrica para a análise da variação da forma da concha de Litorinídeos. Estes autores analisaram imagens digitalizadas da concha de Litorinídeos para investigar as diferenças na forma entre dois ecotipos de *Littorina saxatilis* de duas localidades do NW de Espanha.



## 1. 6. Objectivos

No âmbito do projecto GENEDIF – *Genetic and Morphologic Differentiation on Estuarine Organisms with Contrasting Dispersal Patterns along a Geographical Gradient*, a realização deste trabalho teve como principal objectivo estudar a diferenciação morfológica da concha do gastrópode marinho *Melarhaphe neritoides* ao longo da costa de Portugal e Galiza. Dado que se trata de uma espécie com desenvolvimento planctotrófico relativamente longo (de quatro a oito semanas), o que supõe uma troca considerável de indivíduos entre populações locais, a hipótese proposta é a de que não existirão diferenças de forma ao longo do gradiente geográfico.

## 2. Aspectos da biologia de *Melarhaphe neritoides*

*Melarhaphe neritoides* (L.) é uma espécie de gastrópode prosobrânquio pertencente à família Littorinidae. É um gastrópode marinho da zona supralitoral que se encontra desde a costa da Noruega, continuando no sul pela costa atlântica da Europa e praias do mediterrâneo até Marrocos, e ocorrendo ainda nos Açores, Canárias, e Cabo Verde. Esta espécie é também comum nas praias rochosas da costa da Irlanda (McGrath, 1997). Johannesson (1992) refere que a principal zona de distribuição desta espécie é o mar Mediterrâneo, embora seja permanentemente encontrada nas costas Atlânticas de Portugal, Espanha, França (até à Normandia), e nas costas do sudoeste e do oeste das Ilhas Britânicas.

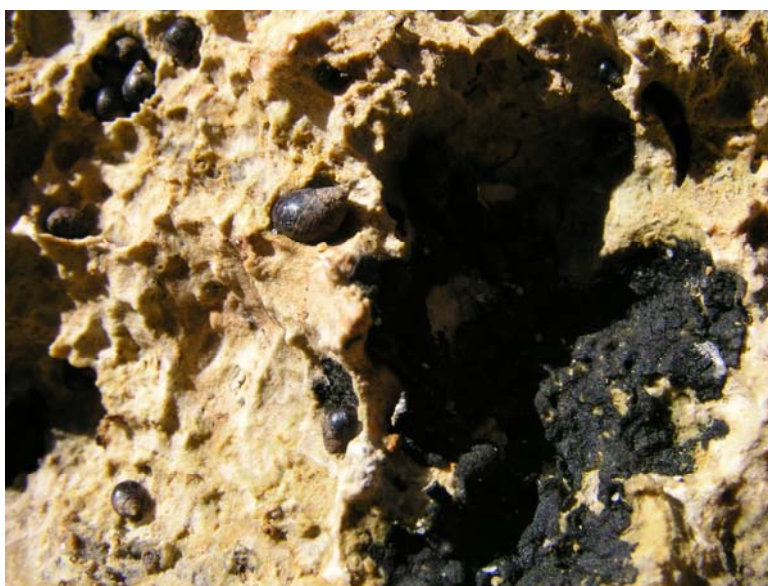


Figura 4.1 - Alguns exemplares de *Melarhaphe neritoides*.

Os Litorinídeos ocupam preferencialmente as fissuras das rochas do supralitoral (ou franja litoral, de acordo com Raffaelli e Hawkins (1996)), que são, no caso de *Melarhaphe neritoides*, usadas para se protegerem do impacto das ondas e da dessecação (Bosch e Moreno, 1986). Esta zona corresponde à zona de humectação, sendo o limite superior de distribuição destes organismos aumentado pela intensificação da acção das ondas. A resistência dos indivíduos

adultos às condições terrestres é tal, que conseguem sobreviver à falta de humidade mais de cinco meses, recuperando no entanto a actividade quando são cobertos pela água (Fretter e Manly, 1977).

A espécie *Melarhappe neritoides* distingue-se das restantes espécies que estão incluídas no género *Littorina* no que diz respeito a várias características. Estas características incluem a existência de linhas escuras longitudinais ao longo dos tentáculos, ausência de glândulas mamiliformes no pénis, estrutura do rim, rádula e tipo de alozimas (Fretter e Manly, 1977) . A sua inclusão no género *Melarhappe* foi aceite por vários autores como Reid, em 1989, com base na análise cladística da estrutura dos Litorinídeos.

*Melarhappe neritoides* apresenta dispersão larvar, e reproduz-se do Outono até à Primavera, altura em que o nível da maré pode subir devido às tempestades, produzindo ovos planctónicos com cápsula ovígera em forma de disco (Daguzan, 1976; Graham, 1988; Fretter e Manly, 1977). Os hábitos reprodutivos desta espécie permaneceram desconhecidos durante um século, após a reprodução vivípara de *Littorina saxatilis* ter sido descrita. As óbvias vantagens da viviparidade para indivíduos vivendo num ambiente aparentemente inóspito, influenciaram alguns zoólogos de modo a atribuírem esta forma de reprodução a *L. neritoides* (Colman, 1933, *cit. in* Fretter e Manly, 1977). Isto foi refutado em 1935, quando Linke e Lebour verificaram que cápsulas ovígeras eram produzidas, cada uma com um único ovo que se desenvolvia numa larva planctónica, designada por velígera.

Grech e Schembri (1989) referem que os indivíduos da zona mediterrânica estão completamente inactivos durante o Verão, formando densos agregados nas fendas das rochas na zona supralitoral, e que apenas se tornam activos em Novembro, quando os adultos migram para a zona inferior para se reproduzirem, durando este período de actividade até Março. Este período de reprodução pode variar consoante a localização geográfica (Cronin *et al.*, 2000).

Para efectuar a postura, as fêmeas deslocam-se para o limite inferior das rochas para atingir a água, e a produção de ovos planctónicos ocorre a intervalos de 15 dias, coincidindo com as marés altas das águas vivas (Daguzan, 1976). Segundo este autor, a cápsula ovígera tem a forma de um disco biconvexo,

medindo em média 0,18 mm de diâmetro e 0,09 mm de altura, e contém um só ovo envolvido por albúmen e por uma casca, que por sua vez estão banhados por uma substância gelatinosa. As cápsulas são libertadas na água do mar e levam uma vida pelágica durante um tempo variável consoante a temperatura e a latitude (três semanas em média). As larvas velígeras eclodem das cápsulas e após um período de tempo relativamente curto vão fixar-se sobre as rochas e sofrer metamorfoses, transformando-se em juvenis com cerca de 0,50 mm de altura de concha. Estas larvas instalam-se sobre as rochas nuas desprovidas de *Fucus*, abaixo da zona dos Balanos. Por fim os juvenis migram gradualmente para níveis mais altos onde se encontram os adultos (Daguzan, 1976, McGrath, 1997). Desta forma, os indivíduos de *Melarhappe neritoides*, após uma fase de ovo e larva que se desenvolvem no plâncton, são separados do meio aquático marinho, do qual vão depender só periodicamente.

Os adultos possuem adaptações morfológicas e fisiológicas indispensáveis a uma vida terrestre, como por exemplo, se se considerar a respiração, uma câmara paleal ricamente vascularizada lembrando as estruturas de “pulmão” dos prosobrânquios terrestres. Por fim, os indivíduos desta espécie alimentam-se de líquenes incrustados, o que os distingue das outras litorinas, que se alimentam de algas, ou de detritos de algas (Daguzan, 1976). No entanto, Fretter (1994) refere que existem locais sem líquenes onde se encontram estes gastrópodes, pelo que deverão estar dependentes dos detritos orgânicos existentes nesses locais.

As características morfológicas mais importantes para a discriminação taxonómica da espécie, relacionadas com a concha do organismo, são a seguir referidas.

#### Morfologia – Características da concha

A anatomia dos moluscos prosobrânquios é descrita detalhadamente por Fretter e Graham (1994). Estes moluscos, onde se inclui *M. neritoides*, possuem a parte visceral do corpo completamente coberta pela concha. A figura 2 mostra características externas da concha de *L. litorea*, um molusco prosobrânquio.

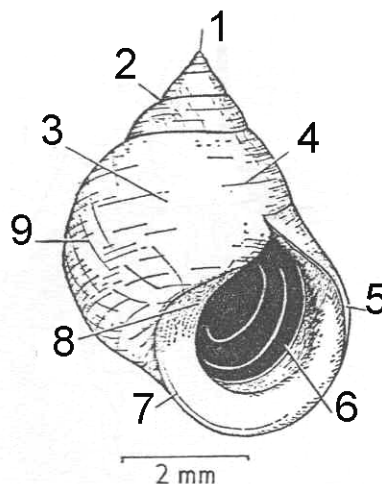


Figura 4.2 - *Littorina littorea*: características externas da concha (adaptado de Fretter e Graham, 1994. 1 – ápice; 2 – sutura; 3 – última volta; 4 – estria espiral; 5 – labro externo; 6 – opérculo; 7 – labro interno; 8 – columela; 9 – estria de crescimento

A concha é constituída por carbonato de cálcio disposto numa matriz de proteína (conchilina). A parte calcária da concha dispõe-se em várias camadas e o todo é coberto por uma camada de conchilina conhecida por periostraco. Em alguns gastrópodes, como *M. neritoides*, esta camada é muito evidente. A concha apresenta uma forma mais ou menos cónica, e consiste essencialmente num tubo que apresenta um diâmetro que vai aumentando, e que se encontra enrolado numa espiral helicoidal, sendo a direcção do enrolamento idêntica à do movimento dos ponteiros do relógio (dextrógira). O tubo encontra-se fechado na parte mais interna, o ápice, mas é aberto na parte externa, que é a abertura da concha por onde o animal projecta o corpo para se alimentar e movimentar. À medida que o animal cresce, este tubo, ou espiral, torna-se mais comprido e mais largo, sendo a parte mais nova a que se encontra junto à abertura, correspondendo o ápice à parte mais antiga. A espiral consiste em vários enrolamentos, designados por voltas, formando a linha de contacto entre as voltas a sutura. A segregação e manutenção da concha fica a cargo do manto, que é apenas activo numa pequena porção da sua extensão, normalmente naquela que se situa junto à abertura. A zona onde as paredes internas das voltas da concha contactam, resulta num pilar central mais ou menos sólido, em torno do qual as

voltas rodam. Este pilar é a columela, e a abertura desta para o exterior é o umbílico.

*Melarhappe neritoides* (L.) apresenta concha quase lisa, independentemente do tamanho ou da idade, a qual está envolvida por um periostraco espesso e com ténues linhas de crescimento espirais e axiais (Britton, 1995). O periostraco cobre a concha e projecta-se na borda da abertura, formando uma aba flexível. A concha tem vértice pontiagudo, podendo atingir 10 mm de altura, mas apresentando em regra menores dimensões (3 a 5 mm). A margem externa do labro no ponto de inserção é paralela à última volta. A concha é espessa, com cerca de seis voltas, sem umbílico, mas com columela lisa. A cor da concha é variável entre o castanho escuro e o cinzento azulado.



Figura 4.3 – Fotografia de um espécime de *Melarhappe neritoides*. A escala corresponde a 6 mm. (exemplar recolhido em Lagos - praia de Figueira).

Reid (1996) cita estudos em que na maioria das espécies de *Littorina* ocorre dimorfismo sexual ao nível da altura da concha, verificando-se que as fêmeas são sempre ligeiramente maiores que os machos. O maior tamanho das fêmeas é atribuído à sua maior taxa de crescimento, ou ainda a uma maior longevidade. Parece também existir selecção sexual, dado que machos mais

pequenos ligados à fêmea durante a cópula diminuem a hipótese de desalojamento do substrato deste par de organismos devido à acção das ondas ou do vento. O grau de dimorfismo ao nível da altura da concha pode variar entre populações, e pode estar ausente em algumas populações cuja espécie é dimórfica noutros locais. O dimorfismo sexual, no que diz respeito à forma, é referido apenas em seis espécies de *Littorina*. No que diz respeito a *Melarhaphe neritoides*, não foram encontradas referências ao dimorfismo sexual desta espécie na pesquisa bibliográfica realizada no âmbito deste trabalho.

### **3. Breve descrição hidrológica e geomorfológica da costa Portuguesa e da Galiza**

O presente estudo foi efectuado na costa continental portuguesa, que se estende por mais de 800 km, e na costa da Galiza. Na costa continental portuguesa ocorre frequentemente *upwelling* de águas frias no verão. A temperatura superficial do mar na costa oeste portuguesa mostra marcada sazonalidade, variando entre 13 e 15° C durante o Inverno, e atingindo 20° C ou mais durante o Verão. As temperaturas na costa sul são geralmente um pouco mais elevadas (aproximadamente 1 a 1,5 °C), devido à influência de correntes mais quentes. As condições médias de ondulação diferem pouco ao longo da costa oeste, a qual está exposta à ondulação oceânica que prevalece de noroeste. A ondulação maior ocorre durante o Inverno, atingindo valores acima de 5 metros na costa oeste e de mais de 3 metros na costa sul. Na costa sul as condições de ondulação são menos severas, porque não está exposta à ondulação gerada no Atlântico Norte (Costa 1995, *cit. in* Boaventura *et al.*, 2002).

O regime das marés na costa portuguesa é semidiurno. A amplitude máxima das marés vivas é aproximadamente de 3 metros.

A Península Ibérica apresenta na camada superior da coluna de água um sistema de correntes induzidas pelos ventos, que por sua vez respondem a um regime sazonal induzido pelas diferenças de pressão atmosférica (Vieira *et al.*, 2003). Durante os meses de Verão, quando o centro de altas pressões dos Açores está localizado na parte central do Atlântico, e o centro de baixas pressões da Gronelândia diminui de intensidade, o gradiente de pressão resultante força a circulação do ar na direcção Sul ao longo da costa da Península Ibérica, induzindo uma corrente superficial para Sul (Haynes e Barton, 1990). Em contraste, durante o Inverno, há uma inversão do regime de ventos, de que resulta uma corrente para Norte que se observa na margem Ocidental da Península Ibérica e atinge a superfície nesta altura (Coelho *et al.*, 2003).



A morfologia da costa portuguesa é marcada pela presença de vários cabos ao longo da costa, particularmente a sul da Nazaré, e de vários rios de elevado caudal na costa norte e centro. Em Portugal, podem ser identificadas três principais zonas de praias rochosas (norte, centro e sul), separadas por extensas áreas de substrato arenoso. A natureza do substrato intertidal rochoso é variável nestas três zonas. Na região norte, desde Moledo do Minho até Aguda as rochas são de natureza granítica, exceptuando Vila Chã, em que as plataformas rochosas são xistos. A zona central é constituída por rochas calcárias. Os xistos constituem a maior parte do substrato rochoso na zona sul da costa oeste e em parte da costa sul, sendo substituídos por rocha calcária até ao limite este na costa sul.

#### **4. Morfometria geométrica – aspectos teóricos**

A morfometria é uma área da biologia que consiste na caracterização da forma dos organismos e na quantificação da variação morfológica. Tem sido aplicada na sistemática, biologia evolutiva e na antropologia física, mas cada vez mais é aplicada a outras áreas como a ecologia, genética e biologia do desenvolvimento (Klingenberg, 2005).

Caracterizar a forma dos organismos de um modo quantitativo tem várias vantagens. A caracterização quantitativa é mais objectiva do que a descrição qualitativa, tornando os resultados mais facilmente reproduzíveis e testáveis. O poder de detecção de pequenas diferenças através destes métodos é superior ao de uma descrição qualitativa. Diferenças subtis podem ser biologicamente relevantes, e dispor de métodos que podem, de uma forma consistente, registar essas diferenças é fundamental.

A morfometria geométrica assenta em duas abstracções. A primeira, é a abstracção da forma de todo o organismo numa série de atributos que podem ser medidos com precisão e tratados por análise matemática. Esta abstracção envolve uma grande perda de informação porque nem toda a forma, tamanho, cor e textura dos espécimes pode ser incorporada na análise, para não mencionar os detalhes da arquitectura histológica ou da ultraestrutura.

Dependendo dos espécimes e do equipamento disponível, um conjunto de medidas de distâncias, a marcação de alguns pontos anatómicos, ou a forma de um contorno, são os dados a ser tratados por uma análise morfométrica. O conhecimento do investigador acerca dos organismos em estudo é crucial neste passo.

A segunda abstracção consiste na transposição destas características mensuráveis para um morfoespaço no qual cada espécime é representado por um único ponto. A relação que se estabelece entre o espaço concreto das duas ou três dimensões do espécime, e a representação do organismo no morfoespaço abstracto, é um aspecto crucial na morfometria. A disposição dos pontos no

morfoespaço uns em relação aos outros indica as relações entre as formas dos diferentes espécimes.

Dependendo do tipo de dados específicos e do tipo de análise a realizar, é frequentemente possível construir gráficos que permitem visualizar factores particulares de variação morfológica relevantes para o estudo a realizar. Por exemplo, estes factores de variação podem ser variações morfológicas como resposta a condições ambientais, os efeitos de determinados genes, ou mudanças ontogénicas associadas com o crescimento.

A morfometria consiste assim na quantificação da estrutura morfológica dos organismos, e apresenta e explica os resultados dessa análise. As palavras “tamanho” e “forma” usadas correntemente adquirem, no contexto da morfometria, novo significado técnico. *Tamanho* refere-se à extensão do espaço de um organismo, ou parte do organismo, a sua magnitude ou dimensão. Pode ser medido de modos variados. *Forma* refere-se às proporções de uma estrutura e ao tamanho relativo e organização das suas partes. Assim, dois objectos têm a mesma forma se forem geometricamente semelhantes, e não existe diferença na forma se eles diferirem unicamente no tamanho, isto é, se um for a cópia aumentada do outro.

No que respeita à decisão sobre o que medir no organismo, a maioria dos estudos morfométricos utiliza marcos anatómicos – pontos localizados de forma precisa em cada espécime em estudo. Bookstein (1991) define cada um destes pontos como pontos que têm correspondência de espécime para espécime, isto é devem ser marcos homólogos entre os espécimes em estudo.

Outros tipos de dados são as medidas de distâncias entre pontos específicos do organismo ou as linhas que demarcam contornos exteriores ou interiores de estruturas do organismo. Actualmente utilizam-se técnicas digitais de aquisição de imagem para dados a duas ou a três dimensões. As medidas obtidas dos diferentes espécimes são gravados, através de aplicativos, na forma de coordenadas para cada ponto.

Os marcos anatómicos estabelecem uma relação simplificada da forma de cada espécime e podem ser usados na análise estatística: cada espécime é representado por uma configuração específica de marcos anatómicos. A escolha

dos marcos deve ser baseada no conhecimento da anatomia dos organismos e deve ser orientada pelo problema biológico que se pretende investigar. Esta escolha irá ter uma importância crucial para todas as análises subsequentes. Segundo Bookstein os marcos anatômicos *são os pontos em que nos baseamos para apresentarmos as explicações sobre os processos biológicos em estudo*. Bookstein (1991), desenvolveu uma classificação detalhada baseada em critérios anatômicos e geométricos e propõe três tipos de marcos: tipo 1 (verdadeiros marcos anatômicos) – são pontos definidos pelo encontro de três estruturas, como por exemplo pontos de ramificação dos sistemas arterial ou nervoso, a duas ou a três dimensões; tipo 2 (pseudo - marcos anatômicos) – correspondem a pontos de máxima curvatura em extensões do corpo e a invaginações. Incluem-se nesta categoria as extremidades de estruturas de predação, como por exemplo garras e dentes e extremidades de partes do osso onde se ligam os músculos; tipo 3 (pontos limítrofes) – estes pontos definem medidas relativas do mesmo objecto homólogo. Incluem, por exemplo, os pontos limítrofes que definem o comprimento máximo ou a largura máxima da carapaça do caranguejo.

Não existe limite para o número de marcos anatômicos a definir por espécime. Em geral o tamanho da amostra deve ser muito maior do que o número de variáveis incluídas na análise, isto é, o número total de coordenadas anatômicas. Para dados a duas dimensões o número de espécimes deve ser pelo menos duas vezes superior ao número de marcos anatômicos. Estes limites estão relacionados com os testes estatísticos e com a generalização dos resultados.

Para extrair a informação sobre a forma, é necessário reescalar as configurações de marcos anatômicos, mudar a sua posição para uma posição padrão e rodá-las para uma orientação padrão. A análise de distâncias de *Procrustes* é um processo fundamental na análise da forma. Este método envolve translação (centra a configuração de marcos anatômicos), rotação (rotação de todas as configurações de marcos de forma a minimizar as distâncias entre elas) e escalamento (padronização da configuração de marcos) a partir do tamanho do centróide (o tamanho do centróide é dado pela raiz quadrada da soma das distâncias quadradas de todos os marcos anatômicos ao respectivo centróide).

No final é obtida uma configuração média da amostra, designada de configuração consenso.

Para a visualização de diferenças na forma aplica-se o método *Thin Plate Spline* (TPS). Nesta técnica, as coordenadas de pontos de referência homólogos são comparadas com as coordenadas de uma configuração de referência (centróide). Por fim, é efectuada a representação gráfica das diferenças entre os grupos de formas, bem como a respectiva análise estatística.

## 5. Materiais e métodos

### 5. 1. Localização das estações de amostragem

A recolha dos organismos foi efectuada em vinte praias rochosas da costa portuguesa e da Galiza (fig. 5.1.1), no período de Novembro de 2003 a Setembro de 2004. Em Portugal, as amostras foram recolhidas em praias rochosas da região Norte, Centro, Sul e Algarve-Sul.

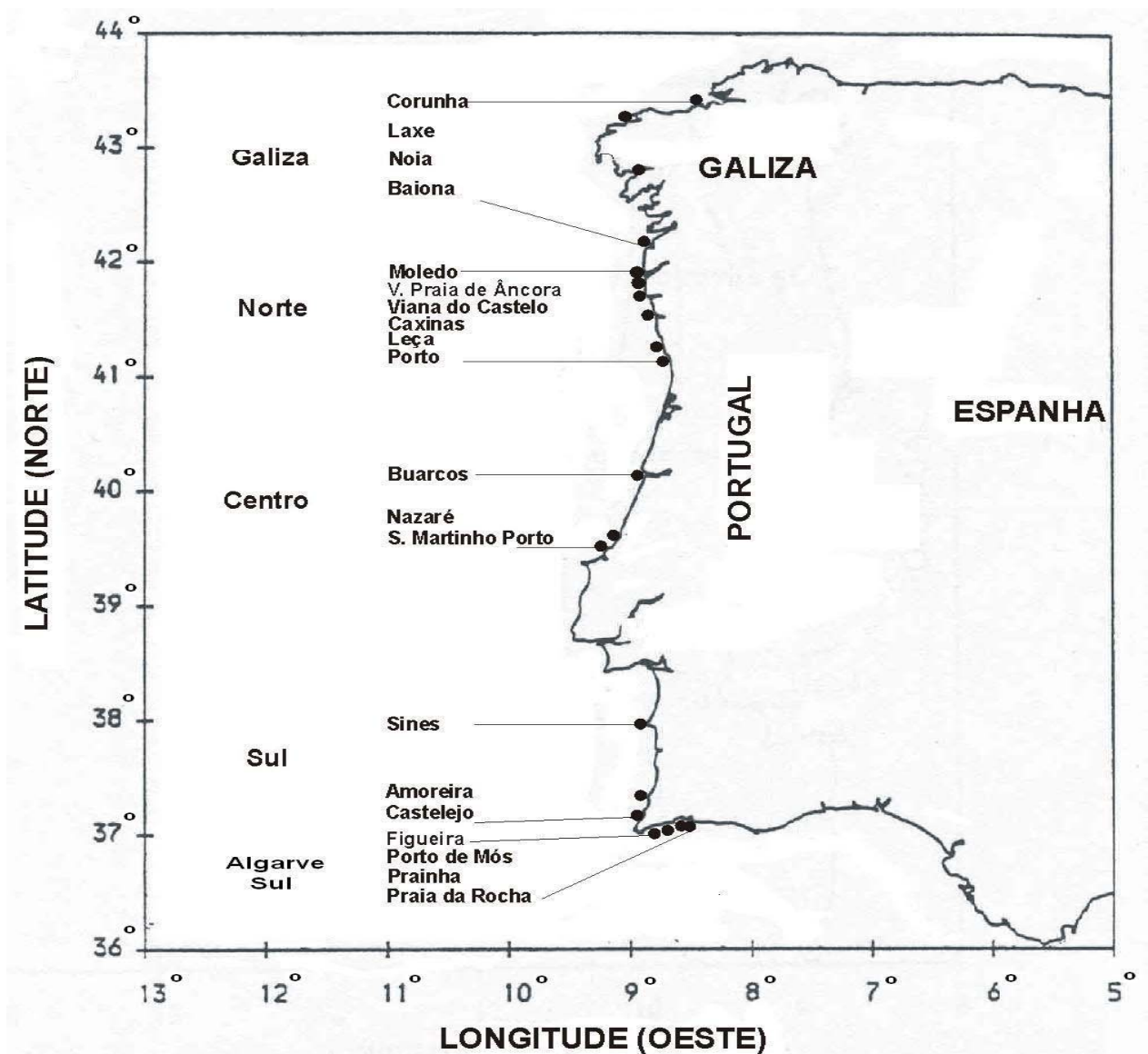


Figura 5.1.1 - Distribuição geográfica dos locais de amostragem ao longo da Costa Portuguesa e Galiza

## 5. 2. Métodos de amostragem biológica

Foi realizada a apanha manual de amostras de organismos, em cada uma das praias referidas, durante o período de baixa-mar, nas fendas das rochas situadas na zona vertical de maior abundância, a zona supralitoral. Para cada amostra foram recolhidos no mínimo 50 indivíduos.

Após a captura, os organismos foram transportados para o laboratório, onde se realizou a sua congelação a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Efectuou-se a conservação dos organismos em álcool etílico a 70% durante cerca de 24 horas. Durante este tempo de conservação o animal enrijece e destaca-se mais facilmente do interior da concha com a ajuda de uma pinça e de uma agulha. A secagem foi feita lentamente e a baixas temperaturas (numa estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  durante três dias) de modo a evitar fracturas na concha.

A bibliografia de apoio utilizada para a identificação de *Melarhaphe neritoides*, foi: Campbell (1998), Graham (1988) e Saldanha (1995).

## 5. 3. Aquisição de dados sobre a forma da concha

Uma amostra aleatória de 30 organismos de cada local foi utilizada nas análises morfológicas. As conchas foram fotografadas com uma câmara digital Nikon D-100 equipada com uma objectiva *AF Micro Nikkor* de 105mm. As imagens foram gravadas e visualizadas em computador utilizando o aplicativo *Nikon Camera Control*.

A concha a fotografar foi colocada numa superfície de cor contrastante (azul), de modo a que o objecto se destacasse do fundo, numa posição fixa. Nesta posição o eixo da espiral (columela) fica num plano paralelo à superfície de apoio e a concha é rodada de modo a que a abertura fique totalmente exposta. Assim, procurou-se que cada espécime ficasse alinhado com o plano focal da câmara de modo a evitar erros sistemáticos. Junto à concha foi colocada uma escala com a identificação do organismo (praia e número), dado que as conchas apresentam diferentes dimensões.

Recorreu-se ao aplicativo *Corel Draw 9.0* para traçar diversas rectas nas imagens dos diferentes indivíduos, com o objectivo de proceder à marcação dos marcos anatómicos de uma forma mais precisa (fig. 5.3.1). A recta A corresponde ao eixo da concha (columela) e foi traçada passando pelo vértice e umbigo. As rectas B e C são paralelas à recta A e tangentes a pontos da concha correspondentes à sua máxima largura. A recta D é perpendicular à recta A e tangente ao limite inferior da concha.

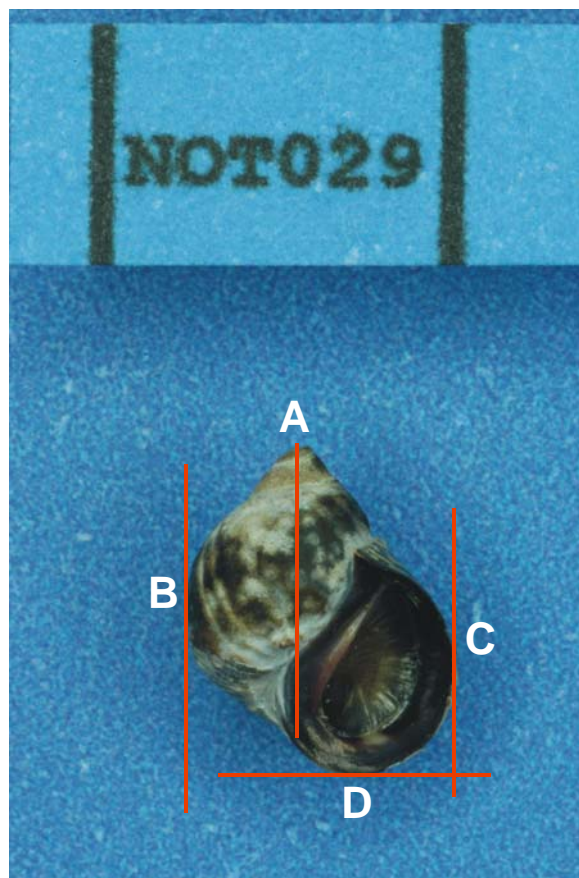


Figura 5.3.1 – Fotografia de um espécime de *Melarhappe neritoides* recolhido na Galiza (Noia – praia do Testal) na qual estão marcadas as rectas para marcação mais precisa dos marcos anatómicos. A escala corresponde a 6 mm.



#### 5. 4. Digitalização dos marcos anatômicos

Em cada imagem procedeu-se à digitalização de oito marcos anatômicos utilizando o programa tpsDig 1.40 (Rohlf, 2004) (fig. 5.4.1).

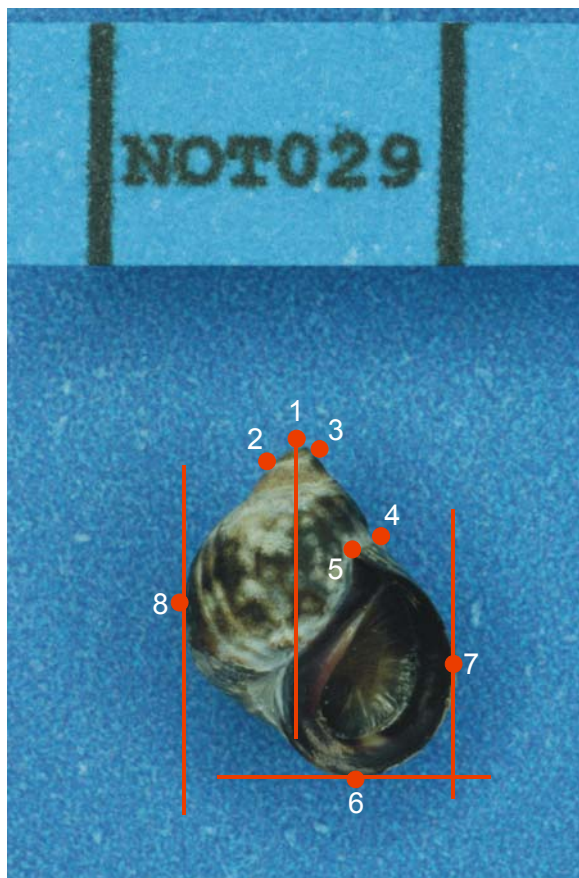


Fig. 5.4.1 - Fotografia de um espécime de *Melarhaphe neritoides* recolhido na Galiza (Noia – praia do Testal) na qual estão registados os marcos anatômicos. A escala corresponde a 6 mm.

Os marcos anatômicos correspondem aos seguintes locais da concha:

Marco 1 – ápice da concha;

Marco 2 – concavidade esquerda da sutura da primeira volta;

Marco 3 – concavidade direita da sutura da primeira volta;

Marco 4 – ponto de junção mais exterior entre a margem externa do labro e a última volta da concha;

Marco 5 – ponto de junção interior entre a margem externa do labro e a última volta da concha;

Marco 6 – limite inferior da concha;

Marco 7 – limite lateral direito da concha;

Marco 8 - limite lateral esquerdo da concha.

Os marcos seleccionados correspondem às seguintes categorias, de acordo com a classificação de Bookstein (1991) atrás referida: tipo I (verdadeiros marcos) – pontos 4 e 5; tipo II (pseudo marcos) – pontos 1, 2 e 3; tipo III (marcos limítrofes) – pontos 6, 7 e 8. Os diferentes marcos devem ser sempre marcados com o mesmo critério. A sequência em que são assinalados deverá ser sempre a mesma, na medida em que cada marco se repete na mesma posição de espécime para espécime.

## 5. 5. Análise e tratamento de dados

Com vista a criar um ficheiro com as coordenadas dos marcos das imagens de cada um dos diferentes espécimes, utilizou-se o programa tpsUtil 1.32 (Rohlf, 2003). De modo a efectuar a análise de Distâncias de Procrustes este ficheiro foi utilizado no programa tpsSuper 1.32 (Rohlf, 2003). Este programa calcula a forma consenso, correspondente à forma média da concha de todos os organismos em estudo. A base de dados fornecida pelo procedimento GPA (*Generalized Procrustes Analysis*) é importada para o programa tpsRelw (Rohlf, 2003), resultando uma ordenação segundo diversos eixos de variabilidade (*Partial Warps*), bem como a visualização da sequência de formas ao longo de cada eixo de variabilidade.

## 6. Resultados

A análise que se segue teve como base a ordenação produzida pelo programa tpsRelw para determinar a variabilidade da configuração da forma da concha, segundo diversos eixos de variabilidade. Verifica-se que 60,14% de variabilidade (para  $\alpha=0$ ) é dada pelos dois primeiros eixos (RW1= 39,50%; RW2= 20,64%). Da ordenação dada pelo programa tpsRelw, a partir dos 605 espécimes de *Melarhappe neritoides* recolhidos obtém-se o gráfico da figura 6.1, que representa as componentes principais para os valores dos dois primeiros *relative warps* (RW1 e RW2).

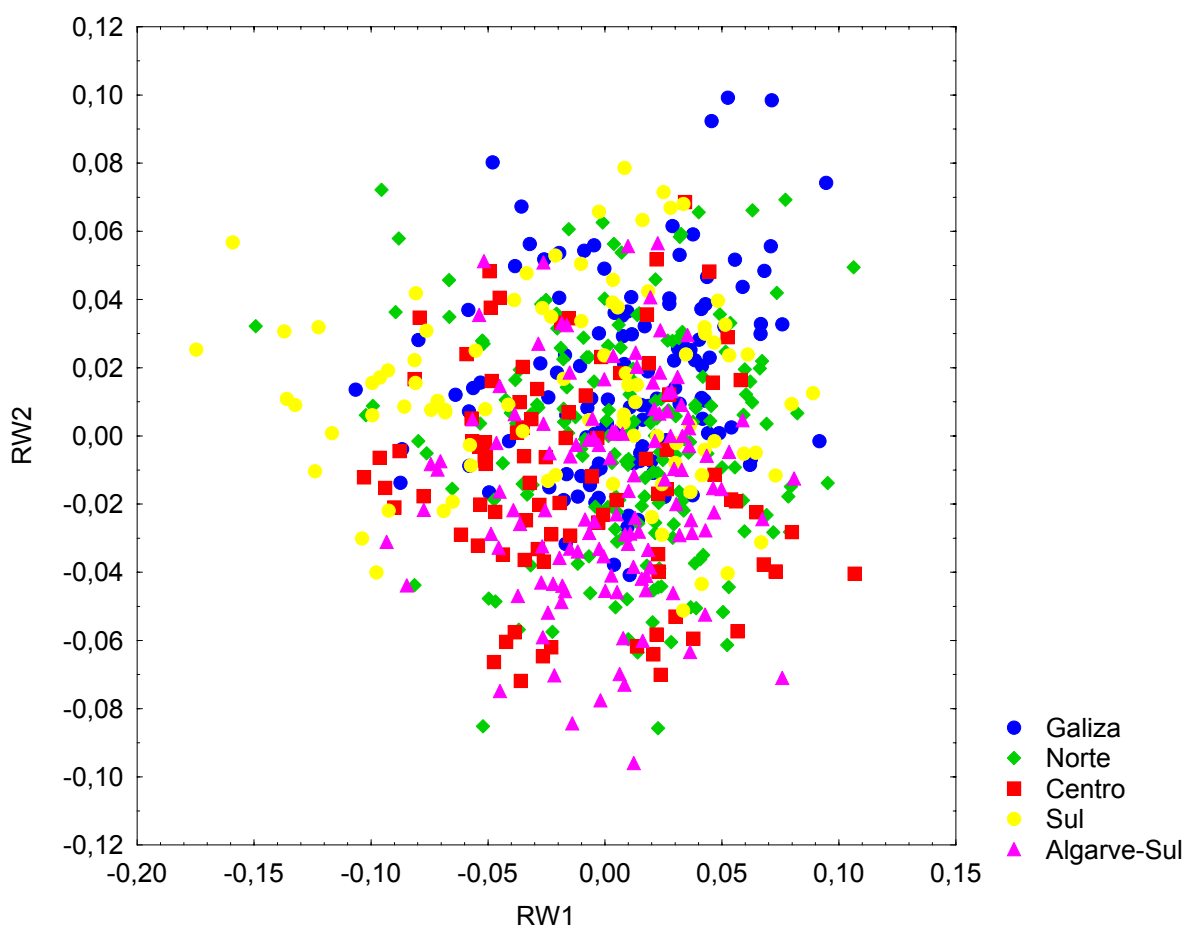


Fig. 6.1 – Diagrama de componentes principais para os valores dos dois primeiros *relative warps* (RW1 e RW2) de vinte locais de amostragem, repartidos em cinco regiões.

O diagrama da figura 6.2 representa as formas estimadas para cada um dos sectores das componentes principais, com base nos mesmos dados.

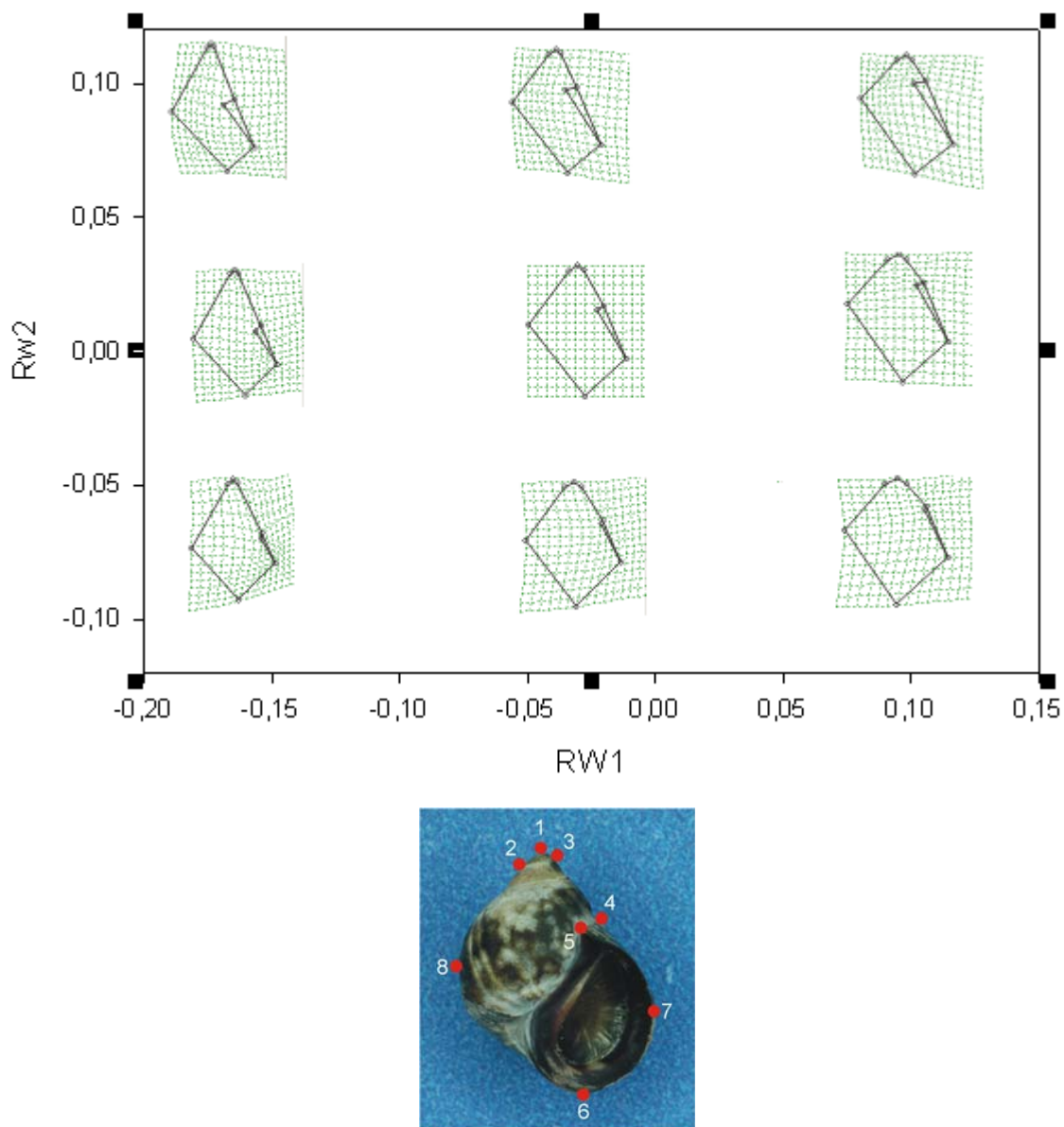


Fig. 6.2 – Formas estimadas para os diferentes sectores do diagrama de componentes principais.

A variabilidade ao longo do eixo RW1, do quadrante negativo para o positivo, traduz-se num alargamento da concha. Isto deve-se a uma distanciação entre os marcos 8 e 6 (limites lateral esquerdo e inferior da concha) e a uma distanciação entre os marcos 7 e 6 (limites lateral direito e inferior da concha). Os marcos 4 e 5 (pontos de junção entre a margem externa do labro e a última volta da concha, respectivamente) mantêm a posição relativa entre si, mas migram em

direcção ao ápice da concha. Os marcos 2 e 3 (concavidades esquerda e direita da sutura da primeira volta), distanciam-se em relação ao ápice, podendo notar-se que a parte superior da concha se torna mais achatada.

A variação da forma da concha ao longo do eixo RW2, do quadrante negativo para o positivo, traduz-se num estreitamento e alongamento da concha. Observa-se um encurtamento da distância entre os marcos 7 e 6 (limites lateral direito e inferior da concha), e um afastamento progressivo dos marcos anatómicos 4 e 5 entre si.

De modo a visualizar se existe algum gradiente na configuração da forma ao longo do eixo Norte-Sul, utilizaram-se duas abordagens: relação dos valores médios de RW1 e RW2 com a latitude (Fig. 6.3) e variação destes com a região geográfica (Fig. 6.4). Os vinte locais de amostragem foram agrupados em cinco regiões: Galiza, Norte, Centro, Sul e Algarve-Sul.

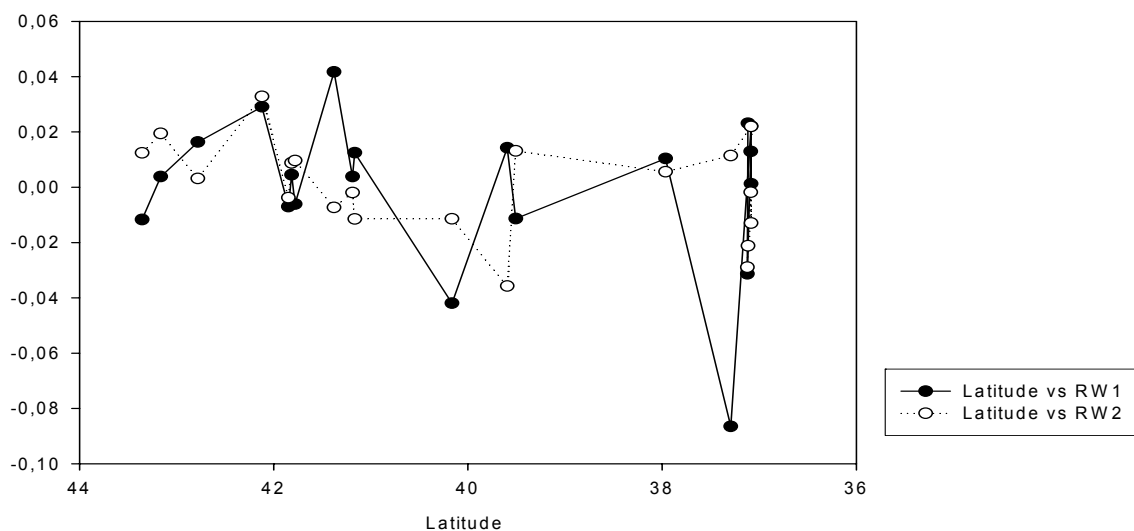


Fig. 6.3 – Variabilidade de RW1 e de RW2 entre os locais de amostragem (valor médio  $\pm$  erro padrão).

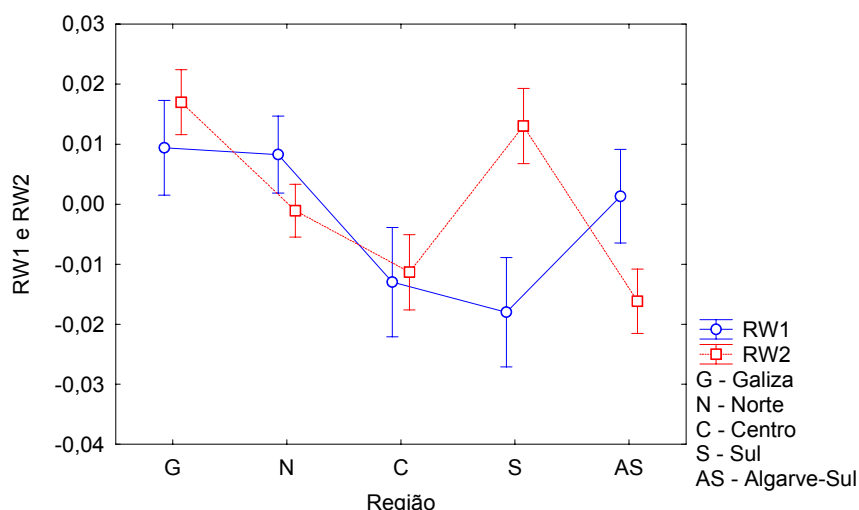


Fig. 6.4 - Variabilidade de RW1 e de RW2 entre os locais de amostragem repartidos por cinco regiões (valor médio  $\pm$  erro padrão)

Para determinar se existe variação da forma com a latitude, analisou-se a relação entre RW1 e RW2 e esta variável através de uma análise de regressão linear, cujos dados foram submetidos separadamente a uma análise de variância (ANOVA), a fim de se testar a significância das regressões efectuadas, tendo-se verificado que a regressão não é estatisticamente significativa para RW1 e para RW2 ( $p > 0,05$ ) (tabela 1).

Tabela 1 – ANOVA da regressão entre RW1 e RW2, e a latitude.  $R^2$  – coeficiente de determinação; F – valor do teste; p – valor de probabilidade

	$R^2$	F (1, 602)	p
RW1	0,045	0,854	0,368
RW2	0,125	2,572	0,126

Comparando as regiões (fig.6.4), verifica-se para os valores de RW1 que existe um gradiente na variação da forma, da Galiza para Sul. Uma informação que sobressai é a de uma diminuição dos valores de RW1 da Galiza até ao Sul, ou seja, os valores de RW1 para Galiza e Norte de Portugal localizam-se no quadrante positivo, e os valores de RW1 para o Centro e Sul localizam-se no quadrante negativo. No que diz respeito à região Algarve-Sul volta a existir um

aumento dos valores de RW1. Relativamente aos valores de RW2, regista-se uma diminuição desses valores da região da Galiza até ao Centro, que é interrompida para a região Sul, voltando a diminuir para a região Algarve-Sul. A variação dos valores de RW1 e RW2 acima descrita, e de acordo com o diagrama da figura 6.2, traduz-se num estreitamento da concha da região da Galiza até ao Sul, tornando-se a concha mais larga para os espécimes da região Algarve-Sul.

Foi efectuada uma análise de variância hierárquica para determinar se existiam diferenças significativas na forma (RW1 e RW2) ao nível das regiões (Galiza, Norte, Centro, Sul e Algarve-Sul), e dos vinte locais de amostragem (Tabela 2). Os valores de RW1 e de RW2 registaram efeitos altamente significativos da região e do local ( $p < 0,001$ ).

Tabela 2 – Análise de variância hierárquica para as variáveis RW1 e RW2, dos efeitos da região e do local de amostragem. SQ – soma dos quadrados; gl – graus de liberdade; QM – quadrado médio; F – valor do teste; p – valor de probabilidade

	SQ	gl	QM	F	p
Local (Região) – RW1	0,388	15	0,026	19,569	0,000
Região – RW1	0,068	4	0,017	12,786	0,000
Local (Região) – RW2	0,078	15	0,005	6,440	0,000
Região – RW2	0,094	4	0,023	29,188	0,000

Para determinar entre que regiões existem diferenças significativas entre pares de médias de RW1 e de RW2, foi aplicado o teste de Tukey, cujos resultados se indicam nas tabelas 3A e 3B. O teste de Tukey permitiu concluir não existirem diferenças significativas entre as médias de RW1 das regiões do Sul e do Centro, ou entre as médias das regiões do Norte, Galiza e Algarve-Sul. Por outro lado, constata-se que as médias de RW1 das regiões do Sul e do Centro diferem significativamente das médias das regiões do Norte e da Galiza.

Tabela 3A – Teste de Tukey para a variável RW1.

Regiões	Média de RW1	1	2	3
S	-0,018	****		
C	-0,013	****	****	
AS	-0,001		****	****
N	0,008			****
G	0,009			****

p = 0,05; Quadrado médio = 0, 002, gl = 600

Tabela 3B – Teste de Tukey para a variável RW2.

Regiões	Média de RW2	1	2	3
AS	-0,016	****		
C	-0,011	****	****	
N	-0,001		****	
S	0,013			****
G	0,017			****

p = 0,05; Quadrado médio = 0, 001, gl = 600

O teste de Tukey permitiu concluir não existirem diferenças significativas entre as médias de RW2 das regiões do Algarve-Sul e Centro, e entre as médias das regiões do Sul e Galiza que, no entanto, diferem significativamente da média das regiões do Algarve-Sul e Centro. As médias das regiões Centro e Norte também não diferem entre si.

Considerando que pode existir uma mudança da forma da concha devido ao desenvolvimento, e para compreender a natureza da variação da forma entre as regiões, testou-se se existiam diferenças significativas na altura das conchas (distância do limite inferior da concha ao vértice) entre as diferentes regiões. O gráfico da figura 6.5 mostra a variação da altura média da concha nas cinco regiões estudadas.



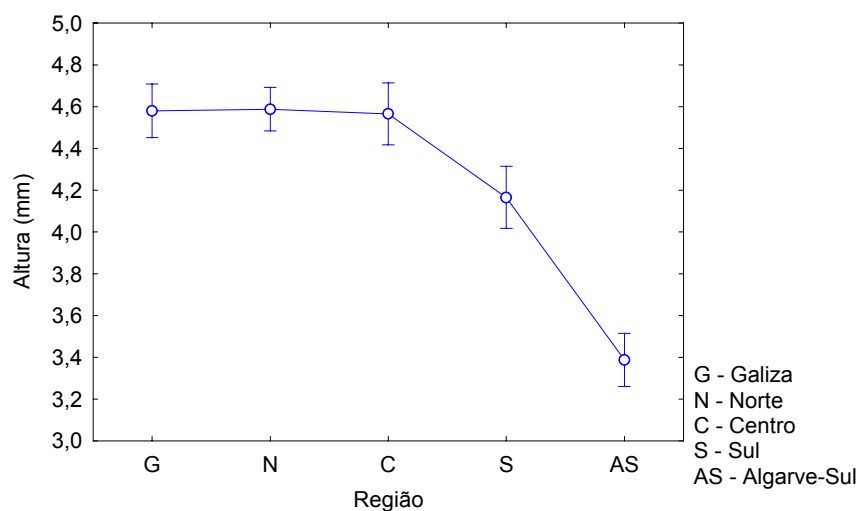


Fig. 6.5 - Variabilidade da altura da concha entre os locais de amostragem repartidos por cinco regiões (valor médio  $\pm$  erro padrão).

A altura média das conchas é maior e semelhante para os espécimes da Galiza, Norte e Centro, e diminui acentuadamente para as regiões do Sul e Algarve-Sul.

Uma ANOVA detectou um efeito significativo da região na altura das conchas ( $p < 0,001$ , tabela 4A).

Tabela 4A – Análise de variância do efeito da região sobre a variável altura da concha, SQ – soma dos quadrados; gl – graus de liberdade; QM – quadrado médio; F – valor do teste; p – valor de probabilidade

	SQ	gl	QM	F	p
Altura da concha	133,7	4	33,42	65,05	0,000

Para determinar entre que regiões existem diferenças significativas para os valores das médias das alturas, foi aplicado o teste de Tukey, cujos resultados se indicam na tabela 4B.

Tabela 4B – Teste de Tukey para a variável *altura da concha*.

Regiões	Média da altura Da concha	1	2	3
AS	3,388	****		
S	4,166		****	
C	4,566			****
G	4,580			****
N	4,588			****

p = 0,05; Quadrado Médio = 0, 514, gl = 599

O teste de Tukey permite concluir não existirem diferenças significativas no tamanho das conchas das regiões da Galiza, Norte e Centro, que no entanto diferem significativamente do tamanho das conchas da região Sul e Algarve-Sul de Portugal. As regiões Sul e Algarve-Sul também diferem significativamente entre si.

Existe portanto variação da altura da concha entre algumas regiões e, para determinar se existe variação da forma com a altura, analisou-se a relação entre RW1 e RW2 e esta variável (gráficos das figuras 6.6 e 6.7). A análise das figuras sugere uma relação entre a variação da forma da concha (RW1 e RW2) e a altura.

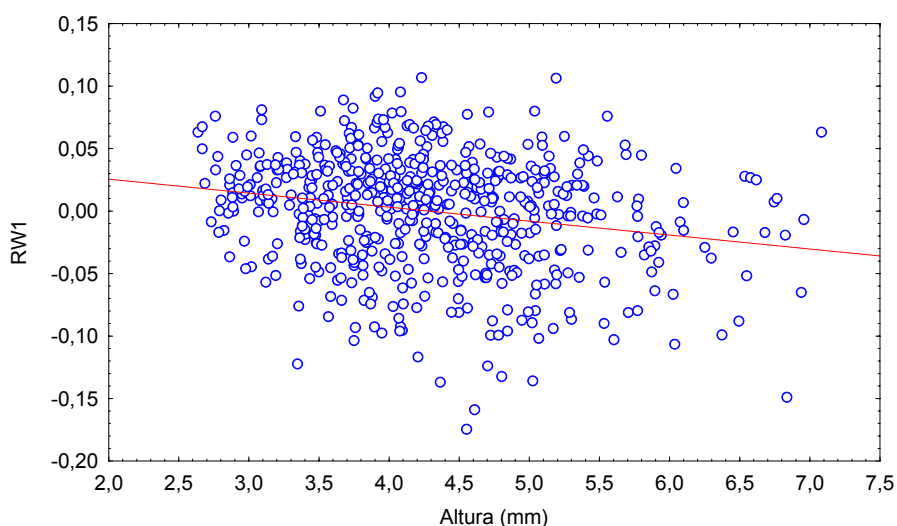


Fig. 6.6 – Regressão linear entre RW1 e a altura da concha.

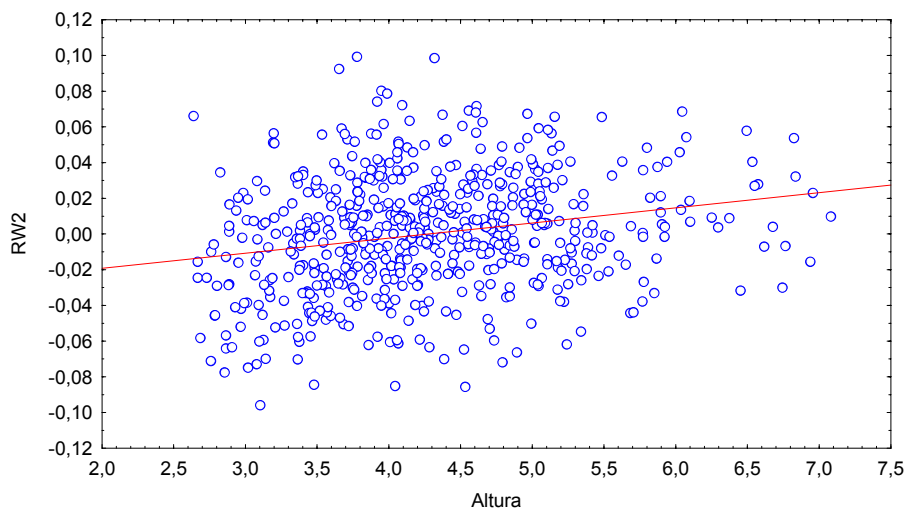


Fig. 6.7 – Regressão linear entre RW2 e a altura da concha.

Submeteram-se os dados separadamente a uma análise de variância (ANOVA), a fim de se testar a significância das regressões efectuadas, tendo-se verificado que a regressão é significativa no caso de RW1 e RW2  $p < 0,001$  (tabela 5).

Tabela 5 – ANOVA da regressão entre RW1 e RW2, e a altura da concha.  $R^2$  – coeficiente de determinação; F – valor do teste; p – valor de probabilidade

	$R^2$	F (1, 602)	p
RW1	0,045	28,19	0,000
RW2	0,049	31,29	0,000

Por inspecção visual das figuras 6.6 e 6.7, parece existir nas conchas cuja altura é menor que 4 mm, uma maior dependência dos valores de RW1 e RW2 com a altura. Assim realizaram-se as análises efectuadas anteriormente, mas agora para conchas cuja altura é maior que 4 mm. O gráfico da figura 6.8. mostra a variação da altura da concha para os indivíduos com mais de 4 mm nas cinco regiões.

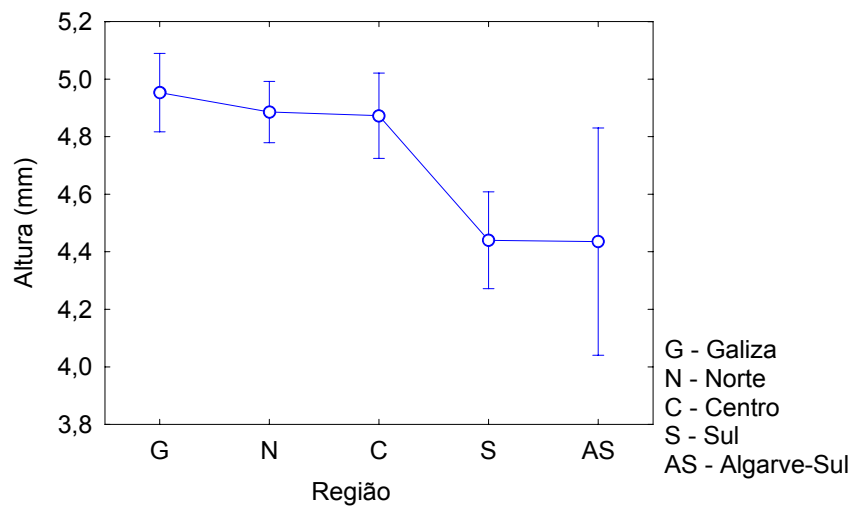


Fig. 6.8 - Variabilidade da altura da concha (> 4 mm) entre os locais de amostragem repartidos por cinco regiões (valor médio  $\pm$  erro padrão)

Uma ANOVA detectou um efeito significativo da região na altura das conchas cuja altura é maior que 4 mm ( $p < 0,001$ , tabela 6A).

Tabela 6A – Análise de variância do efeito da região sobre a variável altura da concha (>4mm),. SQ – soma dos quadrados; gl – graus de liberdade; QM – quadrado médio; F – valor do teste; p – valor de probabilidade

	SQ	gl	QM	F	p
Altura da concha (>4mm)	11,708	4	2,927	7,253	0,000

Para determinar entre que regiões existem diferenças significativas para os valores das médias das alturas (> 4mm), foi aplicado o teste de Tukey, cujos resultados se indicam na tabela 6B. Pode-se concluir não existirem diferenças significativas no tamanho das conchas das regiões da Galiza, Norte e Centro que, no entanto, diferem significativamente do tamanho das conchas do conjunto região Sul e Algarve-Sul de Portugal.

Tabela 6B – Teste de Tukey para a variável *altura* (>4mm).

Regiões	Média da altura	1	2
AS	4,435	****	****
S	4,440	****	
C	4,873		****
N	4,886		****
G	4,953		****

$p = 0,05$ ; Quadrado médio = 0,4 04, gl = 353

Para determinar se existe variação da forma com a altura, analisa-se a relação entre RW1 e RW2 e esta variável. Os gráficos das figuras 6.9 e 6.10 mostram a regressão linear entre RW1 e RW2 e a altura da concha (>4 mm). Os dados mostrados nas figuras foram submetidos separadamente a uma análise de variância (ANOVA), a fim de se testar a significância das regressões efectuadas, tendo-se verificado que a regressão é significativa no caso de RW1 ( $p < 0,01$ ) e não é estatisticamente significativa para RW2 ( $p > 0,05$ ) (tabela 7).

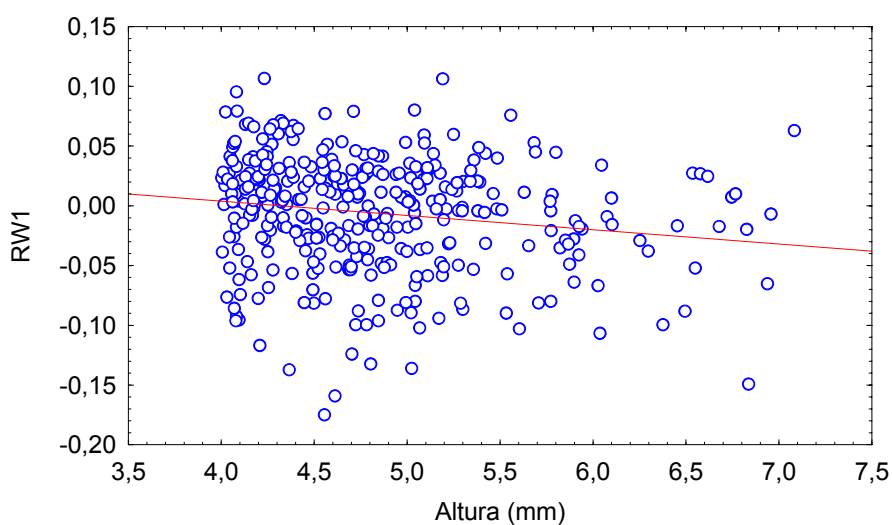


Fig. 6.9 – Regressão linear entre RW1 e a altura da concha (> 4 mm).

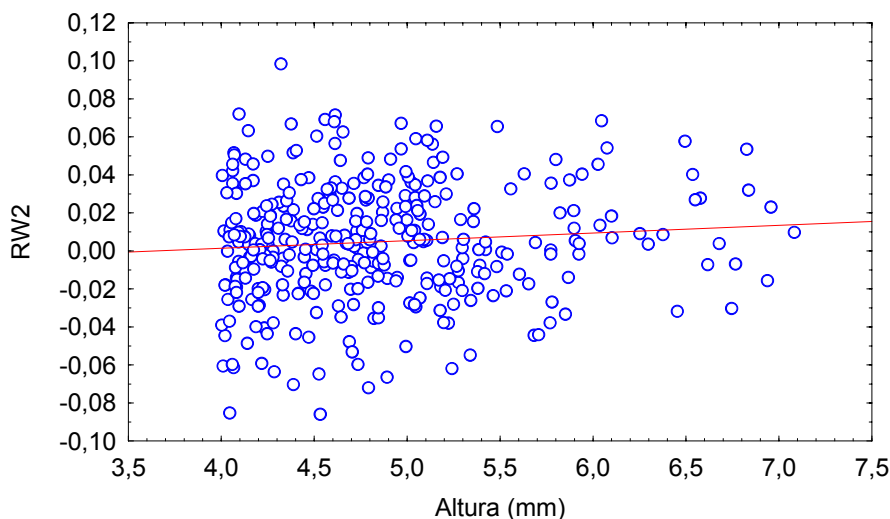


Fig. 6.10 – Regressão linear entre RW2 e a altura da concha (>4 mm).

Tabela 7– ANOVA da regressão entre RW1 e RW2, e a altura da concha (>4mm).  $R^2$  – coeficiente de determinação; F – valor do teste; p – valor de probabilidade

	$R^2$	F (1, 356)	p
RW1	0,0273	10,00	0,0016
RW2	0,0076	2,72	0,0998

Considerando que os espécimes das regiões da Galiza, Norte e Centro não apresentam diferenças significativas ao nível da altura da concha (tabela 4B) e que existe variação significativa na forma da concha (RW1 e RW2) nestas três regiões (Tabelas 3-A e 3-B), pode-se concluir que a variação da forma da concha dos espécimes destas regiões se deve a pressões selectivas do ambiente. Por outro lado, sendo os espécimes das regiões Sul e Algarve-Sul (tabela 4B) significativamente mais pequenos que os restantes, e tendo sido detectada a existência de alometria, a variação da forma observada nestes espécimes não poderá ser exclusivamente atribuída a pressões selectivas do ambiente.

A figura 6.11 mostra indivíduos caracterizados por valores médios de RW1 e RW2 para as cinco regiões, para todos os espécimes. Esta figura mostra claramente uma progressão da forma da concha de *Melarhaphe neritoides* de Norte para Sul, verificando-se um estreitamento, voltando a alargar a concha nos espécimes do Algarve-Sul.

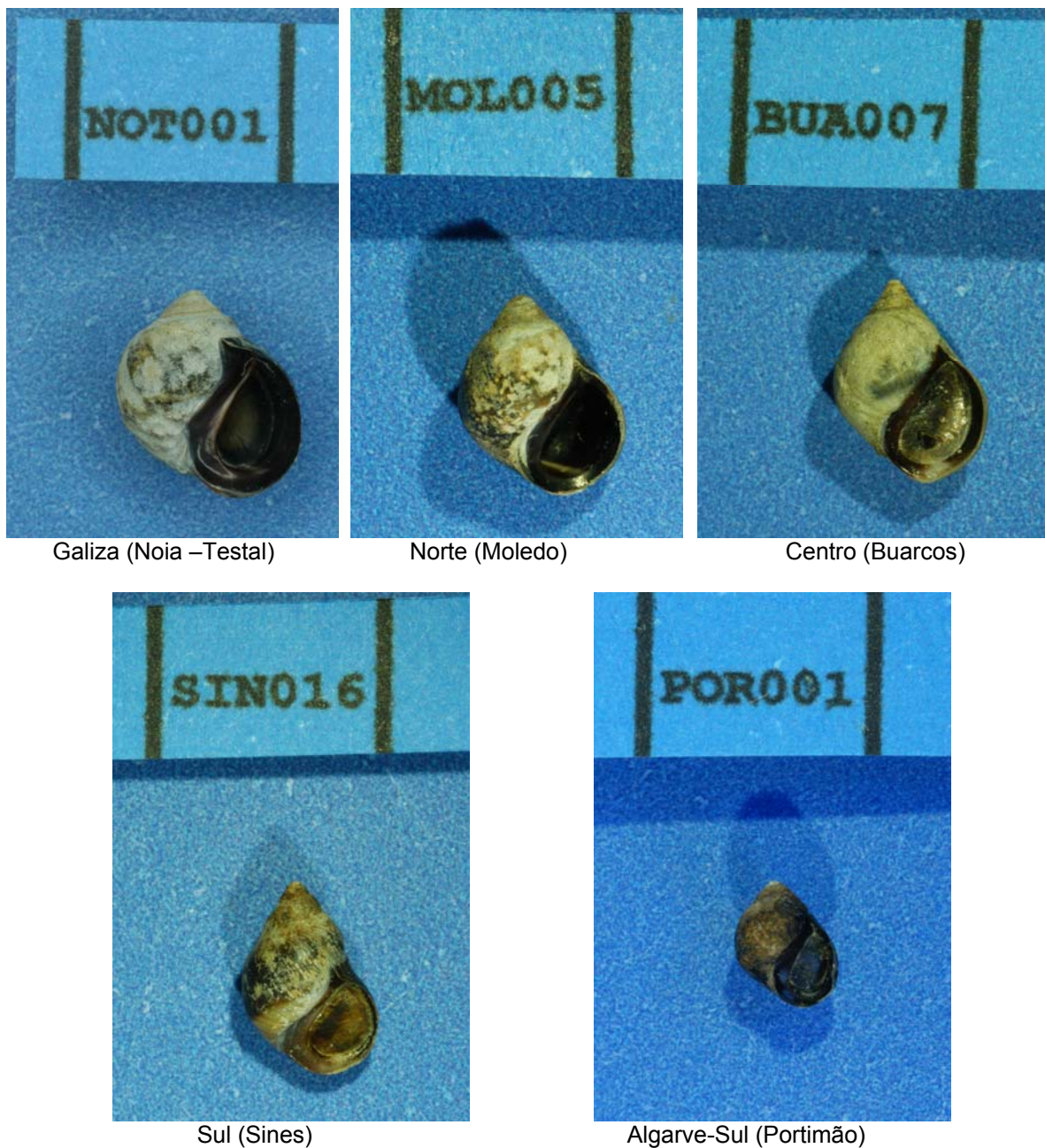


Figura 6.11 – Fotografias de espécimes de *Melarhaphe neritoides* recolhidos nas regiões da Galiza, Norte, Centro, Sul e Algarve-Sul de Portugal. A escala corresponde a 6 mm.

A variação da forma da concha de *Melarhaphe neritoides* de Norte para Sul deve-se a um alongamento da região do ápice, a um estreitamento da concha, e a um distanciamento dos pontos de inserção da última volta com a margem externa do labro, relativamente ao ápice.

Foi realizada uma análise discriminante para determinar a contribuição das variáveis RW1e de RW2 para a distinção da forma da concha das populações



das cinco regiões (Galiza, Norte, Centro, Sul e Algarve-Sul de Portugal), para todos os espécimes. Todos os dados foram submetidos a análise canónica, e os resultados desta análise estão representados na figura 6.12.

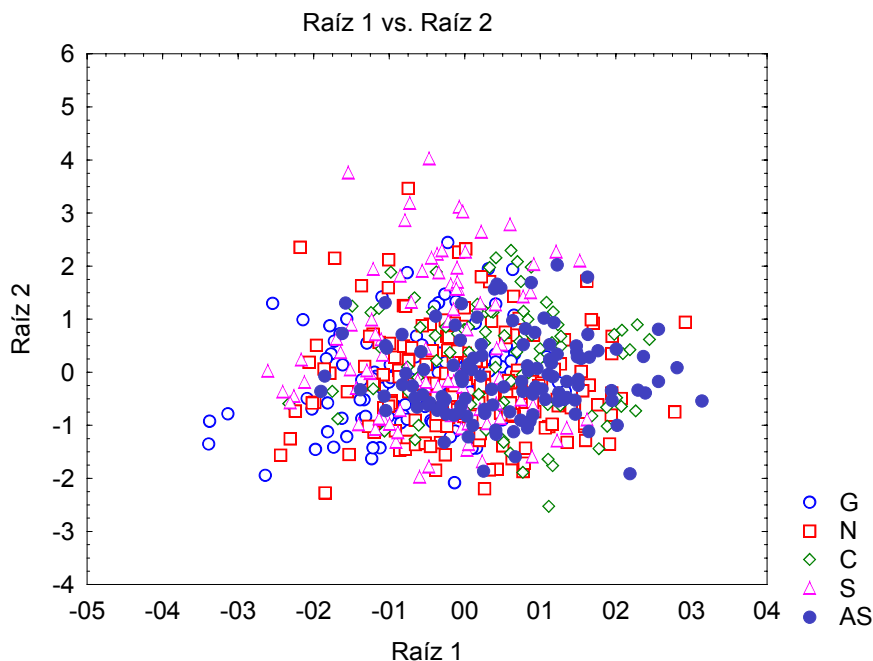


Fig. 6.12 – Análise canónica. Representação da primeira função discriminante (Raíz 1) contra a segunda função discriminante (Raíz 2).

Tabela 8 – Testes de Chi quadrado com funções discriminantes sucessivamente eliminadas.

	Raízes (Eigen)	Raízes canónicas	Wilks' Lambda	Chi quadrado	gl	p
0	0,172	0,383	0,807	128,817	8	0,000
1	0,057	0,233	0,946	33,509	3	0,000

Com base nos resultados indicados na tabela 8, pode-se concluir que ambas as raízes canónicas são significativas. Os coeficientes estandardizados para as variáveis canónicas da análise discriminante dos *relative warps* de RW1 e RW2 das várias regiões encontram-se representados na tabela 9. A tabela mostra que a primeira função discriminante (Raíz 1) é mais influenciada pela variável RW2. A segunda função (Raíz 2) é marcada principalmente pela variável



RW1. Cerca de 75% (proporção cumulativa) do poder discriminante é explicado pela primeira função, como se pode constatar a partir da tabela.

Tabela 9 - Coeficientes estandardizados para as variáveis canónicas

Variáveis	Raíz 1	Raíz 2
<b>RW1</b>	-2,068	-22,633
<b>RW2</b>	-32,961	2,717
<b>Raízes (Eigen)</b>	0,172	0,057
<b>Proporção cumulativa</b>	0,750	1,000

Para determinar o grau de predição das funções de classificação para os grupos formados (representados na figura 6.12), foi elaborada uma matriz de classificação (tabela 10).

Tabela 10 – Matriz de classificação

	Percentagens	G p=0,198	N p=0,301	C p=0,149	S p=0,149	AS P= 0,203
<b>G</b>	30,8	37	69	1	10	3
<b>N</b>	63,7	24	116	3	12	27
<b>C</b>	6,7	7	45	6	9	23
<b>S</b>	24,4	20	40	6	22	2
<b>AS</b>	30,9	8	69	6	2	38
<b>Total</b>	36,2	96	339	22	55	93

A matriz mostra as percentagens de indivíduos que estão correctamente classificados, e daqueles que estão mal classificados, para as cinco regiões em estudo. Como se pode observar, 36% de todos os indivíduos são classificados correctamente. Destes, 31% dos indivíduos da região da Galiza, 64% dos

indivíduos da região Norte, 7% dos indivíduos da região Centro, 24% dos indivíduos da região Sul, e 31% dos indivíduos da região Algarve-Sul estão correctamente classificados. Esta matriz também inclui informação, no cabeçalho de cada coluna, relativa às probabilidades de classificação *a priori*. Podemos concluir que as variações da forma da concha associadas a RW1 e RW2 permitem classificar os indivíduos de *Melarhappe neritoides* da região Norte de uma forma mais correcta, comparativamente com os indivíduos das outras regiões. Assim, o morfotipo destes indivíduos (concha mais alargada, ápice mais achatado, e com os pontos de inserção da última volta com a margem externa do labro, mais próximos do ápice), distingue-se mais facilmente dos restantes pertencentes às outras regiões.

## 7. Discussão e conclusões

Um dos objectivos deste trabalho foi o de determinar a variação morfológica da concha de *Melarhappe neritoides* ao longo da costa de Portugal e da Galiza, tendo para tal sido aplicados métodos de morfometria geométrica. A hipótese proposta neste trabalho de que não existiriam diferenças de forma ao longo do gradiente geográfico foi rejeitada. O presente estudo mostra existirem variações na forma da concha que correspondem a dois segmentos da Costa Ibérica. No segmento de costa que inclui a Galiza, Norte e Centro de Portugal, existe variação latitudinal na forma da concha de *Melarhappe neritoides*, enquanto que no segmento de costa que inclui o Sul e Algarve-Sul de Portugal, não se pode concluir existir variação latitudinal na forma da concha. A concha de *Melarhappe neritoides* da região da Galiza é mais achatada no ápice, mais alargada e com os pontos de inserção da última volta com a margem externa do labro mais próximos do ápice, comparativamente com a concha das populações do Norte e Centro da costa portuguesa em que ocorre um estreitamento da concha e um alongamento do ápice, e ainda uma distanciação ao ápice dos pontos de inserção da última volta com a margem externa do labro. Os espécimes destas regiões não apresentam diferenças significativas ao nível da altura da concha, pelo que a mudança da forma não poderá ser atribuída ao efeito do tamanho da concha. Estas variações latitudinais na forma podem assim ser atribuídas a pressões selectivas do ambiente. Os espécimes da região do Sul mantêm a tendência de variação da forma da concha que existe nas regiões anteriormente referidas, isto é, um estreitamento da concha, voltando no entanto a concha a alargar nos espécimes da região Algarve-Sul. Verifica-se que os espécimes das regiões Sul e Algarve-Sul são significativamente mais pequenos do que os restantes, e tendo sido detectada alometria, a variação da forma observada nestes espécimes não poderá ser atribuída exclusivamente a pressões selectivas do ambiente.

Analisa-se de seguida dois cenários alternativos para explicar a variação latitudinal que se observa na costa da Galiza, Norte e Centro de Portugal. O primeiro cenário relaciona-se com uma reduzida escala de dispersão dos

organismos e o segundo cenário com um grande fluxo de indivíduos. A primeira situação é contrariada pelo tempo de desenvolvimento pelágico relativamente longo de *Melarhappe neritoides* (que é de 3 semanas em média segundo Daguzan (1976) e de 4 a 8 semanas segundo Johannesson (1992)). Por outro lado é suportada pela existência de diferenças significativas na forma da concha entre os locais de amostragem detectadas no presente estudo. As condições locais devidas ao efeito da temperatura, acção das ondas, predadores e competição, resultam em habitats com características específicas responsáveis por diferentes pressões selectivas a nível geográfico. O reduzido fluxo genético implica isolamento reprodutivo das populações locais, o que cria condições para adaptação local e, conseqüentemente, diferenciação genotípica. O cenário de existência de grande fluxo de indivíduos é por outro lado suportado pelo tempo de desenvolvimento pelágico desta espécie em estudo, associado a níveis elevados de fluxo genético. As condições locais responsáveis por diferentes pressões selectivas a nível geográfico (temperatura, acção das ondas, predadores e competição) podem neste caso favorecer selectivamente fenótipos mais apropriados se existir uma larga variedade fenotípica de base, sem que isso implique diferenciação genética entre as populações locais.

Uma explicação para a forma mais globosa das conchas das populações recolhidas mais a norte da costa Ibérica (Galiza e Norte de Portugal), pode residir em diferenças de temperatura da água entre a costa Norte e a costa Sul, já que na costa Sul as temperaturas são geralmente um pouco mais elevadas (aproximadamente 1 a 1,5 °C) (Costa, 1995, *cit. in* Boaventura *et al.*, 2002). Como referido anteriormente, existe um maior custo energético da calcificação em águas frias, nas quais o carbonato de cálcio é mais solúvel, que se reflecte numa alteração da forma da concha, a qual se torna mais globosa e mais fina (Graus, 1974; Clark, 1983, *cit. in* Reid, 1996). A variação da forma da concha que foi observada neste estudo de Norte para Sul e no segmento da Costa Ibérica Galiza-Centro de Portugal também pode estar relacionada com uma adaptação à regulação da temperatura,. Por analogia com outros Litorinídeos (Vermeij, 1973, *cit. in* Reid, 1996), em que se verifica um alongamento da concha e correspondente redução da abertura, de Norte para Sul, esta tendência pode ser

interpretada como adaptativa por contribuir para uma dissipação do calor mais eficaz.

O reduzido tamanho da concha dos espécimes das regiões Sul e Algarve-Sul de Portugal poderá ser explicado pelo facto deste tamanho se traduzir num aumento da relação área de superfície/ volume que está relacionada com uma maior dissipação de calor (Britton, 1995).

Para além dos factores ambientais atrás referidos, a densidade populacional pode também influenciar a forma da concha. Kemp e Bertness (1984, *cit. in* Reid, 1996) referem que gastrópodes litorínídeos com dispersão larvar (*Littorina littorea*) crescem mais rapidamente e produzem conchas com paredes pouco espessas, e com formas mais globulares e pouco espiraladas, a baixas densidades populacionais. Assim, seria particularmente interessante estudar o efeito da variável densidade populacional na variação da forma da concha de *Melarhappe neritoides*.

## 8. Referências bibliográficas

- Boaventura, D., Ré, P., Fonseca, C., Hawkins, J. (2002). Intertidal rocky shore communities of the continental Portuguese coast: Analysis of distribution patterns. *Marine ecology*, **23**: 69-90.
- Bookstein, L. (1991). *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press.
- Bosch, M. Moreno, I. (1986). Spatial distribution of *Littorina neritoides* (L. 1758) (Mollusca:Gastropoda) in the supralittoral zone in the Balearic islands. *Cahiers de Biologie Marine*, **27**: 53- 62.
- Britton, J. C. (1995). The relationship between position on shore and shell ornamentation in two size-dependent morphotypes of *Littorina striata*, with an estimate of evaporative water loss in these morphotypes and in *Melarhaphe neritoides*. *Hydrobiologia*, **309**: 129- 142.
- Campbell (1998). *Fauna e flora do litoral de Portugal e Europa*. Guias Fapas.
- Carvajal-Rodríguez, A., Conde-Padín, P., Rolán-Alvarez, E. (2004). Decomposing shell size and morphology by geometric-morphometric methods in two sympatric ecotypes of *Littorina saxatilis*. Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunologia, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo.
- Clarke, A. (1983). Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ecosystems. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*. **21**: 341-453.
- Coelho, H., Leitão, P., Neves, R. (2003). Estrutura vertical e meridional da corrente da Vertente Continental Ibérica: observações e modelação. 3º Simpósio sobre a Margem Ibérica Atlântica.

- Colman, J. (1933). The nature of the intertidal zonation of plants and animals. *Journal of the Marine Biological Association of the U. K.*, **18**, 435 – 76.
- Costa, M. (1995). Agitação marítima na costa portuguesa. *An. Inst. Hidrogr.*, **13**: 35 – 40.
- Crisp, D. J. e Fischer-Piette, E. (1959). Repartition des principales espèces intercotidales de la côte atlantique française en 1954-1955. *Annales de l'Institute Océanographique*, **36**: 275 – 388.
- Cronin, M. A., Myers, A. A., O'Riordan, R. M. (2000). The reproductive cycle of the intertidal gastropod *Melarhaphe neritoides* on the west and south coasts of Ireland. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, **100B**, 2, 97-106.
- Cruz, R., Rolán-Alvarez, E., Garcia, C. (2001). Sexual selection on phenotypic traits in a hybrid zone of *Littorina saxatilis* (Olivi). *J.Evol. Biol.* **14**: 773-785.
- Daguzan, J. (1976). Contribution a l'écologie des Littorinidae (Mollusques gastéropodes prosobranches). *Cahiers de Biologie Marine*, **17**, 213-236.
- Etter, R. J. (1988a). Asymmetrical developmental plasticity in an intertidal snail. *Evolution*, **42**: 322 – 334.
- Fretter, V., Graham, A. (1994). *British Prosobranch Molluscs: Their functional anatomy and ecology*. Ray Society. London.
- Fretter, V., Manly, R. (1977). The settlement and early benthic life of *Littorina neritoides* (L.) at Wembury, S. Devon. *Journal of Molluscan Studies*, **43**, 255-262.

- Graham, A. (1988). *Molluscs: Prosobranch and pyramidellid gastropods*. Synopses of the British Fauna (ns). Linnean Society of London.
- Graus, R. (1974). Latitudinal trends in the shell characteristics of marine gastropods. *Lethaia*, **7**: 303-314.
- Grech, M., Schembri, P. (1989). A laboratory study of the behavioural responses of *Littorina neritoides* (Mollusca:Gastropoda) in relation to its zonation on Maltese shores (Central Mediterranean). *Mar. Behav. Physiol.*, Vol. **15**, 123-135.
- Haynes, R., Barton, E. D. (1990). A poleward flow along the Atlantic Coast of the Iberian Peninsula. *J. Geophys. Res.*, **95**, 11425-11441.
- Johannesson, K. (1992). Genetic variability and large scale differentiation in two species of littorinid gastropods with planktotrophic development, *Littorina littorea* (L.) and *Melarhaphe (Littorina) neritoides* (L.) (Prosobranchia: Littorinaceae), with notes on a mass occurrence of *M. neritoides* in Sweden. *Biological Journal of the Linnean Society*, **47**: 285-299.
- Johannesson, B., Johannesson, K. (1996). Population differences in behaviour and morphology in *Littorina saxatilis* : phenotypic plasticity or genetic differentiation?. *Journal of Zoology*.
- Johannesson, K. (2003). Evolution in *Littorina*: ecology matters. *Journal of Sea Research* **49**, 107-117.
- Kemp, P., Bertness, M. (1984). Snail shape and growth rates: evidence for plastic shell allometry in *Littorina littorea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* , **81**: 811- 813.



- Klingenberg, C. P. (2005). *Analysis of organismal form – An introduction to morphometrics*. Web based course.
- Kinne, O. (1970). Temperature: Invertebrates. In *Marine Ecology* (Kinne, O., Ed.), **1**: 407-514. Wiley - Interscience, London.
- McGrath, D. (1997). Population structure and recruitment of the intertidal gastropod *Melarhappe neritoides* (L.) on an exposed rocky shore on the south coast of Ireland. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, **97B**, 1, 75-79.
- Mill, P. J. e Grahame, J. (1990). Distribution of the species of rough periwinkle (*Littorina*) in Great Britain. *Hydrobiologia*, **193**: 21-27.
- Raffaelli, D., Hawkins, S. (1996). *Intertidal ecology*. Chapman & Hall.
- Reid, D. G.(1996). *Systematics and evolution in Littorina*. The Ray Society. Dorchester.
- Rohlf, F. J. (1990). Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**: 299-316.
- Rohlf, F. J. (2003a). TpsDig, versão 1.39, Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook.
- Rohlf, F. J. (2003b). TpsRel, versão 1.29, Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook.
- Rohlf, F. J., Marcus, L. F. (1993). A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* **8**: 129-132.
- Saldanha, L. (1995). *Fauna submarina atlântica*. Publicações Europa América.

- Seeley, R. H. (1986). Intense natural selection caused a rapid morphological transition in a living marine snail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, **83**: 6897-6901.
- Sundberg, P. (1988). Microgeographic variation in shell characters of *Littorina saxatilis* Olivi – a question mainly of size? *Biological Journal of the Linnean Society*, **35**: 169- 184.
- Vermeij, G. J.(1973). Morphological patterns in high intertidal gastropods: adaptive strategies and their limitations. *Marine Biology, Berlin*, **20**: 319 – 346.
- Vermeij, G. J.(1978). *Biogeography and adaptation: patterns of marine life*. Harvard University Press, Cambridge, Massachussets.
- Vieira, N., Mateus, M., Coelho, H. (2003). Distribuições de temperatura, salinidade e correntes geostróficas na Margem Ibérica Atlântica. 3º Simpósio sobre a Margem Ibérica Atlântica.
- Warmoes, T., Dumoulin, E. e Reid, D. G. (1992). The distribution of *Littorina* and *Melarhappe* along the continental coast of the English Channel. In: *Proceedings of the Third International Symposium on Littorinid Biology*. (Grahame, J., Mill, P. J. e Reid, D. G., eds.), 293-303. Malacological Society of London, London.
- Zar, J. H. (1984). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall.